
**Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Vorstand: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann
(Lehrstuhl Bakteriologie)**

**Analyse der *Yersinia*-Interaktion mit Thrombozyten unter besonderer
Berücksichtigung des
YopM Effektorproteins**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von
Wiebke Lohmann**

**aus
Göttingen**

**Jahr
2007**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Siess
Priv. Doz. Dr. U. Wintergerst
Prof. Dr. M. Sperandio

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:** Dr. med. C. Barz

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 11.10.2007

*„Solange die Dinge klein sind, gib ihnen Wurzeln.
Wenn sie grösser werden, gib ihnen Flügel.“
Indisches Sprichwort*

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	
1.1 Die Gattung <i>Yersinia</i> und ihre humanmedizinische Bedeutung	1
1.2 Grundlagen der Pathogenität von <i>Yersinia enterocolitica</i> und <i>Y. pseudotuberculosis</i>	2
1.3 Die Yop Effektor-Proteine	2
1.3.1 YopN/ YopB/ YopD	4
1.3.2 YopP/ J	4
1.3.3 YopE	5
1.3.4 YopH	5
1.3.5 YopO/ YpkA	5
1.3.6 YopT	6
1.3.7 YopM	6
1.4 Die Cystein-Protease Calpain	8
1.5 Ziele dieser Arbeit	11
 2. Material und Methoden	
2.1 Material	
2.1.1 Geräte und Materialien	13
2.1.2 Chemikalien	14
2.1.3 Kitsysteme	15
2.1.4 Antikörper	16
2.1.5 Enzyme	16
2.1.5.1 Restriktionsenzyme	16
2.1.5.2 DNA-Polymerasen	16
2.1.5.3 Weitere Enzyme	17
2.1.6 Nährmedien	17
2.1.7 Plasmide/ Vektoren	17
2.1.8 Bakterienstämme	18
2.1.8.1 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	18
2.1.8.2 <i>Yersinia enterocolitica</i> -Stämme	18
2.1.9 Eukaryote Zelllinien	19
2.1.10 Oligonukleotide für PCR und Sequenzierungen	19

	Seite
2.2 Methoden	
2.2.1 Mikrobiologische Methoden	
2.2.1.1 Anzucht von Yersinien und <i>E. coli</i>	20
2.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Bakterienkulturen	20
2.2.1.3 Ausplattieren von Bakterien	20
2.2.1.4 Lagerung von Bakterien	20
2.2.1.5 Sezernierte Proteine aus Yersinien	21
2.2.2 Zellbiologische Methoden	
2.2.2.1 Kultivierung von humanen HeLa-Zellen	21
2.2.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl von HeLa-Zellen	21
2.2.2.3 Infektion von HeLa-Zellen mit Yersinien	22
2.2.2.4 Aufreinigung von humanen Thrombozyten	22
2.2.2.5 Inkubation von Thrombozyten mit Yersinien	22
2.2.3 Mikroskopische Methoden	
2.2.3.1 Immunfluoreszenz (IFT)	22
2.2.3.2 Morphologische Differenzierung und Flächenmessung von Thrombozyten	23
2.2.4 Molekularbiologische Methoden	
2.2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	24
2.2.4.2 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	24
2.2.4.3 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung von DNA	24
2.2.4.4 Restriktionsverdau	25
2.2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese von DNA	25
2.2.4.6 Elution von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel	26
2.2.4.7 Ligation von DNA-Fragmenten	26
2.2.4.8 Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen und Transformation	26
2.2.4.9 Herstellung elektrokompenter <i>Yersinia</i> -Zellen und Transformation	27
2.2.4.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	27
2.2.4.11 Sequenzierung von DNA	28
2.2.5 Proteinchemische Methoden	
2.2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
2.2.5.2 Proteintransfer auf Membranen	29
2.2.5.3 Immunologische Detektion	29
2.2.5.4 Zytoskelettseparation	30
2.2.5.5 Koimmunopräzipitation	30

3. Ergebnisse	Seite
3.1 Analyse der Interaktion zwischen Yersinien und Thrombozyten	33
3.1.1 Adhäsionskinetik von Thrombozyten	33
3.1.2 Untersuchung des Einflusses des YopH-, YopE-, YopP- und YopO-Effektorproteins auf das Zytoskelett von Thrombozyten	34
3.1.3 Charakterisierung von YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM)	36
3.1.4 Untersuchung des Einflusses des YopM-Effektorproteins auf das Zytoskelett von Thrombozyten	37
3.1.5 Morphologische Untersuchung der mit Yop-Monosekretionsmutanten inkubierten Thrombozyten	39
3.1.6 Flächenmessung der mit Yop-Monosekretionsmutanten inkubierten Thrombozyten	44
3.1.7 Untersuchung des Einflusses von <i>Yersinia</i> -Monodeletionsmutanten auf das Zytoskelett von Thrombozyten	47
3.1.8 Klonierung von WA-C(pTRANS,pCJYM-HA)	49
3.1.9 Lokalisation von YopM-HA nach Inkubation von Thrombozyten mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA)	50
3.2 Analyse der Interaktion zwischen dem <i>Yersinia</i> -YopM-Effektorprotein und HeLa-Zellen	50
3.2.1 Lokalisation von YopM in infizierten HeLa-Zellen	50
3.2.2 Untersuchung des Einflusses des YopM-Effektorproteins auf das Zytoskelett von HeLa-Zellen	52
3.2.3 Untersuchung des Einflusses des C-Terminus von YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) auf das Zytoskelett von HeLa-Zellen	54
3.3 Untersuchung der Interaktion zwischen Calpain und YopM	58
3.3.1 Das Zytoskelett und die Rolle von Calpain	58
3.3.2 Nachweis von Calpain in HeLa-Zellen	58
3.3.3 Nachweis der Calpain-Autodegradation in Thrombozyten	59
3.3.4 Untersuchung des Einflusses von Calpeptin und YopM auf das Zytoskelett von Thrombozyten	60
3.3.5 Untersuchung des Einflusses von Calpeptin und YopM auf das Zytoskelett von HeLa-Zellen	61
3.3.6 Untersuchung der Interaktion zwischen Calpain und YopM in vivo in HeLa-Zellen	63
3.4 Untersuchung des funktionellen Einflusses von YopM auf Calpain	65
3.4.1 Aktivierung und Inhibition von Calpain in mit Yop-Monosekretionsmutanten inkubierten Thrombozyten	65
3.4.2 Dauer der Calpainaktivierung in mit Yop-Monosekretionsmutanten inkubierten Thrombozyten	66

	Seite
4. Diskussion	
4.1 Untersuchung des Einflusses der <i>Yersinia</i> -Yop-Effektorproteine auf das Zytoskelett von Thrombozyten	69
4.2 Einfluss von YopM auf das Zytoskelett und Lokalisation von YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) in HeLa-Zellen	72
4.3 Einfluss des C-Terminus von YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) auf das Zytoskelett von HeLa-Zellen	73
4.4 Untersuchung der Interaktion zwischen Calpain und YopM in vivo	74
4.5 Untersuchung des funktionellen Einflusses von YopM auf Calpain	75
4.6 Biologische Relevanz der Ergebnisse	76
5. Zusammenfassung	77
6. Abkürzungsverzeichnis	79
7. Literaturverzeichnis	83
8. Dank	97
9. Lebenslauf	99

1. Einleitung

1.1 Die Gattung *Yersinia* und ihre humanmedizinische Bedeutung

Die gramnegativen Stäbchenbakterien Yersinien, Salmonellen und Shigellen gehören zu den enteroinvasiven Erregern und gelten als Prototypen zum Studium der Interaktion mit Wirtszellen und der folgenden Auswirkung auf Zytoskelettdynamik und Signaltransduktionskaskaden.

Yersinien gehören zur Familie der Enterobacteriaceae, unter denen man eine Gruppe verwandter gramnegativer Stäbchen versteht, die sich fakultativ unter anaeroben Bedingungen vermehren. Der Genus *Yersinia* beinhaltet elf Arten, von denen drei humanmedizinische Bedeutung haben: *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* (Perry et al., 1997).

Die Pest, hervorgerufen durch *Yersinia pestis*, ist eine der ältesten, bekanntesten und gefährlichsten Infektionskrankheiten für Menschen. Entdeckt wurde der Erreger 1894 in Hongkong durch den Schweizer Alexandre Yersin. Das sporen- und geißellose, dadurch unbewegliche Stäbchen lässt sich von den anderen Yersinienarten durch die Fähigkeit zur Harnstoffspaltung unterscheiden (Perry et al., 1997). Im Mittelalter trat die Pest endemisch auf, heute kommt sie nur noch sporadisch in wenigen Ländern vor. Die Möglichkeit einer epidemischen Ausbreitung besteht in einigen Regionen jedoch immer noch (Fauci et al., 1998). Im letzten Jahrzehnt sind der WHO etwa 15.000 Fälle gemeldet worden. Die Pest ist eine akute fieberhafte Zoonose, hauptsächlich der Ratte, die über den Rattenfloh und andere Ektoparasiten auf den Menschen übertragen werden kann. Meist kommt es zur lymphogenen Streuung der Yersinien, klinisch erkennbar an charakteristischen druckschmerzhaften Bubonen. Kommt es zur Streuung in die Blutbahn resultiert eine Pestsepsis, bei einer Streuung in die Lunge eine sekundäre Lungenpest mit hochinfektiösem Sputum. Die Inkubationszeit beträgt zwischen 1-7 Tage, bei direkter aerogener Infektion nur wenige Stunden. Unbehandelt hat die Bubonenpest eine Letalität von 50-60%, die Pestpneumonie und Pestseptikämie fast immer 100%. Bei adäquater und rechtzeitiger Therapie mit Tetracyclinen, Chinolonen oder Cotrimoxazol sinkt die Letalität der Beulenpest auf ca. 5-10%, bei der Pestseptikämie lediglich auf 33-60%. Die Diagnose der Pest erfolgt durch den Nachweis des Erregers im Bubonenpunktat, Sputum oder Blut. Dabei wird die Mikroskopie und die Kultur eingesetzt (Robert Koch-Institut, 2005).

Yersiniosen sind bakterielle Darminfektionen des Menschen mit *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis*, die vor allem im kühleren Klima auftreten. Kontaminierte Nahrungsmittel (rohes Fleisch, Milch) und Wasser sind für die Weiterverbreitung des Erregers aus dem Tierreservoir anzunehmen (Shayegani et al., 1982). *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* bilden bei Wachstumstemperaturen unter 30°C Geißeln aus und sind somit beweglich. Klinisch zeigt sich eine Infektion durch eine Lymphadenitis mesenterica mit terminaler Ileitis (v.a. bei *Y. pseudotuberculosis*), die schwer von einer Appendizitis zu unterscheiden ist. Oder als Enteritis/ Enterocolitis mit selbstlimitierender Diarrhö (*Y. enterocolitica*). Chemotherapeutische Maßnahmen sind in der Regel nicht erforderlich. In Assoziation mit HLA-B27 kann es 1-3 Wochen nach der Infektion zu einer reaktiven Arthritis, einem Erythema nodosum oder anderen Hauterscheinungen kommen (Fauci et al., 1998). Die Diagnose einer Yersiniose kann durch den kulturellen Nachweis des Erregers erbracht werden. Die Identifizierung der Keime erfolgt aufgrund physiologischer Merkmale. Zum Nachweis von

Antikörpern kann ein Immunoblot-Test, die Agglutinationsreaktion oder ein ELISA eingesetzt werden (Heesemann et al., 1987).

Zwischen *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* besteht, was den genauen molekularen Ablauf der Infektion betrifft, zum Teil Übereinstimmung. Da jedoch die hervorgerufenen Krankheitsbilder eklatante Unterschiede aufweisen, müssen trotz der zahlreichen Gemeinsamkeiten wesentliche pathogenetische Unterschiede vorhanden sein, die Gegenstand aktueller Forschung sind.

1.2 Grundlagen der Pathogenität von *Yersinia enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*

Als primäre Eintrittspforte nutzen Yersinien die im terminalen Ileum vorhandenen Lymphfollikel, die auch als Peyer-Plaques bezeichnet werden (Autenrieth et al., 1996). Die Dünndarmschleimhaut weist im Bereich der Peyer-Plaques keine Darmzotten auf, sondern trennt an diesen Stellen das Darmlumen von den darunter liegenden Lymphfollikeln direkt mit ihrer Epithelzellschicht ab. Die Epithelzellschicht der Peyer-Plaques besteht aus Saumzellen und vereinzelt liegenden membranösen Epithelzellen, den sogenannten M-Zellen. M-Zellen sind in der Lage, durch Pino- und Transzytose Proteine und Bakterien wie Yersinien von der Seite des Darmlumens zu den darunter liegenden Lymphfollikeln zu transportieren. Hier werden sie Immunzellen wie Makrophagen, polymorphkernigen Neutrophilen und B-Zellen zur Antigenpräsentation und Eliminierung (durch z.B. Phagozytose) präsentiert.

Zunächst können Yersinien dem Immunsystem entgehen durch die pYV-kodierten (plasmid of *Yersinia* Virulence) *Yersinia* outer proteins (Yops), die mit Hilfe eines Typ-III-Mikroinjektionsapparates in das Zytosol der Wirtszelle injiziert werden. Die Yops können in vielfältiger Weise Signaltransduktionskaskaden inhibieren, die normalerweise durch die Abwehrzellen aktiviert würden und so der sofortigen Eliminierung entgehen. Die Yops können auch die Umstrukturierung des Zytoskeletts während der Phagozytose beeinflussen und so das Überleben im Wirtsorganismus fördern (Juris et al., 2002). In der Regel werden enteropathogene Yersinien nach einigen Tagen über bis heute unbekannte Mechanismen vom Wirt eliminiert, was den selbstlimitierenden Charakter der Erkrankung erklärt.

1.3 Die Yop Effektor-Proteine

Das unter Yersinien hochkonservierte, 70kb große Virulenzplasmid (siehe Abb.1), trägt die Gene für Yops die Komponenten und Regulatoren des Typ-III-Mikroinjektionsapparats (Portnoy und Martinez, 1985).

Verantwortlich für die Expressionskontrolle des Virulenzplasmids ist der Transkriptionsfaktor VirF/LcrF (Lambert de Rouvroit et al., 1992). Dieser induziert bei einer Erhöhung der Umgebungstemperatur und Calcium-Mangel bzw. bei Kontakt der Yersinie mit einer Wirtszelle die Expression und Sekretion der Effektorproteine in das Zytoplasma (Heesemann et al., 1986, Rosqvist et al., 1994; Sory und Cornelis, 1994). Sechs Yop-Effektorproteine werden in die eukaryote Zelle transloziert: YopE, YopH, YopM, YopO/ YpkA, YopP/ YopJ und YopT, wobei Unterschiede in der Nomenklatur zwischen *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* bestehen. YopO und YopP aus *Y. enterocolitica* werden mit YpkA und YopJ in *Y. pseudotuberculosis* bezeichnet (Bolin et al., 1985).

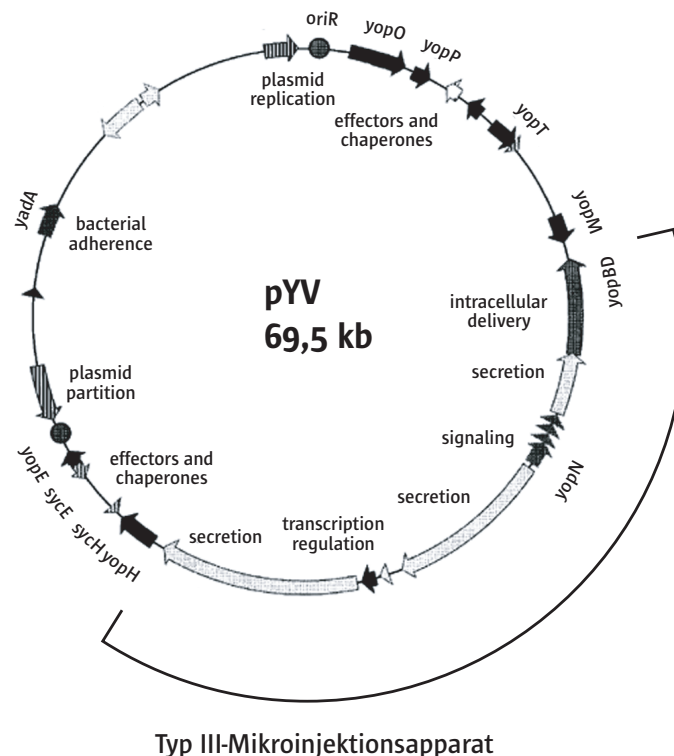


Abbildung 1:
Genetische Karte des pYV-Plasmids von *Y. enterocolitica* (Serotyp 09),
modifiziert nach Iriarte und Cornelis, 1998.

Jedes dieser sechs Effektorproteine trägt C-terminal eine Effektordomäne und N-terminal ein Yop-charakteristisches Sekretions-Signal, das bei der Sekretion nicht abgespalten wird (Michiels et al., 1998). Neben diesem Signal besitzen Effektorproteine N-terminal eine Translokations-Domäne, die für ihren Transport über die Plasmamembran der eukaryotischen Zielzelle verantwortlich ist (Sory et al., 1995). Im Zytoplasma der Yersinien liegen einige Yops zunächst durch Chaperone stabilisiert vor. Nicht für alle Yops sind in *Yersinia spp.* Chaperone bekannt. SycE, SycH, SycT, SycN und SycD (specific Yop chaperone) sind jeweils spezifisch für die Effektorproteine YopE, YopH und YopT, den Regulator YopN und den Translokations-Faktor YopD (Cornelis et al., 1997). Die für die Chaperone kodierenden Sequenzen liegen jeweils stromauf- oder stromabwärts der Gene für ihre entsprechenden Effektorproteine (Forsberg et al., 1990). Es konnte gezeigt werden, dass die Translokations-Domänen von YopE und YopH zugleich auch die Bindestelle für ihre spezifischen Chaperone SycE und SycH sind (Lee et al., 1998; Woestyn et al., 1996). Da Chaperone für die Translokation der Effektorproteine in die Zielzelle nötig sind, selbst aber nicht in diese hineingebracht werden, wird angenommen, dass ihre Aufgabe darin besteht, intrabakterielle Wechselwirkungen zwischen YopE und YopH mit den Translokationsproteinen YopB und/ oder YopD zu verhindern (Hacker et al., 2000). Eine schematische Übersicht über die intrazelluläre Wirkungsweise der Yops gibt Abbildung 2.

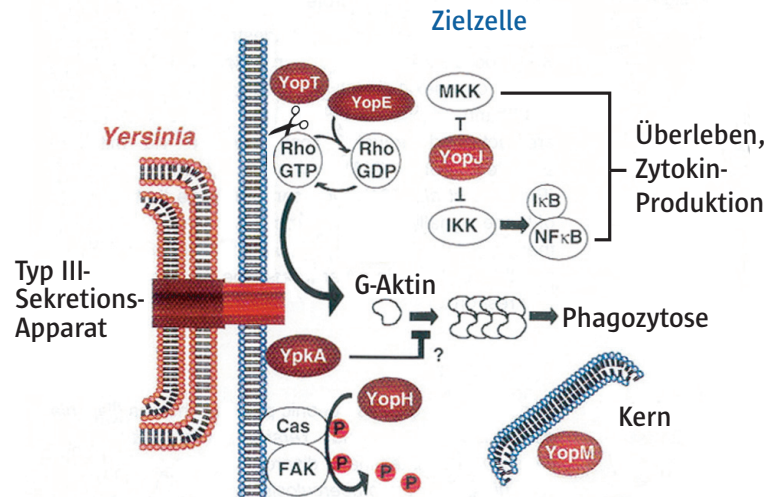


Abbildung 2:
Schematische Darstellung der Wirkungsweise der Effektorproteine von *Yersinia spp.* auf die verschiedenen Signaltransduktionswege eukaryotischer Zellen, modifiziert nach Juris et al., 2002.

1.3.1 YopN/ YopB/ YopD

YopN hat offenbar ausschließlich regulatorische Funktionen auf den Export der Effektorproteine. Es wirkt möglicherweise als eine Art Verschlussstopfen, der nach Interaktion der Yersinie mit der Wirtszelle entfernt wird. Wahrscheinlich bilden YopB und D im Anschluß einen Kanal durch die eukaryote Zellwand, so dass die Effektor-Yops in die Zielzelle transloziert werden können (Cornelis, 2002).

1.3.2 YopP/ J

YopP (*Y. enterocolitica*) und das hoch homologe YopJ (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*) supprimieren die Freisetzung von Interleukin-8 (IL-8) (Schesser et al., 1998) und TNF-α (Boland et al., 1998a) in vielen Zelltypen und induzieren Apoptose in Makrophagen (Monack et al., 1998).

YopP inhibiert das Protein eIF2B, einen Regulator der Protein-Translation (Sauvonnet et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von eIF2B zur Apoptose führt (Pap et al., 2002).

Andere entscheidende Faktoren, die zur Apoptose durch YopP beitragen, sollen die Aktivierung von Caspase-8 und die Inhibition von NFκB-induzierter Transkription sein (McDonald et al., 2003).

Durch Inhibition von NFκB und MAP-Kinase-Signaltransduktionswegen kommt es zu einer verminderten Freisetzung der Entzündungsmediatoren IL-8 und TNF-α (Aepfelbacher et al., 1999).

Durch eine Verminderung der Entzündungsmediatoren verzögert YopP die Aktivierung der adaptiven Immunantwort, die Makrophagen-Aktivierung und Entzündungsprozesse und somit die Elimination der Yersinien (Ruckdeschel et al., 1998).

1.3.3 YopE

YopE depolymerisiert Mikrofilamente, zerstört das Aktin-Zytoskelett und wirkt dadurch, wie auch YopH, antiphagozytisch und schützt Yersinien vor Immunzellen des Wirtes (Ruckdeschel et al., 1996; Faellmann et al., 1995; Rosqvist et al., 1988). HeLa-Zellen, in die YopE injiziert wurden, runden sich ab und verlieren ihre Anheftung an das Substrat (Rosquist et al., 1991). Für diesen zytotoxischen Effekt scheint die Region zwischen AS 90-215 notwendig zu sein (Aili et al., 2003).

YopE weist Sequenzhomologien zu den Toxinen Exoenzym S aus *Pseudomonas aeruginosa* und SptP aus *Salmonella typhimurium* auf, die als GAPs (GTPase activating proteins) auf kleine G-Proteine der Rho-Familie wirken (Black und Bliska, 2000; von Pawel-Rammingen et al., 2000; Fu und Galan, 1999; Goehring et al., 1999). Durch *in vitro* Experimente konnte bewiesen werden, dass YopE an den G-Proteinen Rho, Rac und Cdc 42 als GAP wirkt (Black und Bliska, 2000; von Pawel-Rammingen et al., 2000). Andor et al. konnten *in vivo* zeigen, dass YopE in HUVEC Rac- aber nicht CDC42- oder Rho-regulierte Aktinstrukturen inhibiert (Andor et al., 2001). Wird jedoch das Arginin im aktiven Zentrum von YopE mutiert (Argininfinger), so geht die GAP-Aktivität des Proteins und damit auch seine antiphagozytotische Wirkung verloren (Black und Bliska, 2000).

1.3.4 YopH

Eines der ersten Effektorproteine, das genauer charakterisiert wurde, war YopH (Rosquist et al., 1988). YopH zeichnet sich durch eine hohe Sequenzhomologie zu eukaryotischen Proteintyrosinphosphatasen aus (Guan et al., 1990). Wie auch YopE wirkt YopH antiphagozytisch (Faellman et al., 1997; Ruckdeschel et al., 1996). Über Inaktivierung der PIP3-Kinase (Phospho-Inositol-Trisphosphat) kann YopH die Expression von MCP1, einem chemotaktischen Zytokin für Makrophagen, hemmen (Sauvonnet et al., 2002). Außerdem kann YopH die Funktionen der B- und T-Lymphozyten unterdrücken, indem es die Phosphorylierung von Antigenrezeptor-Signalkomplexen hemmt (Yao et al., 1999). YopH dephosphoryliert Bestandteile des fokalen Adhäsionskomplexes (FA) eukaryotischer Zellen und führt dadurch zur Dissoziation der focal adhesions (Hamid et al., 1999; Black and Bliska, 1997; Persson et al., 1997). Da der FA-Komplex an der Signaltransduktion des Integrin-Rezeptors beteiligt ist, kommt es bei Dissoziation des FA zur Inhibition der Integrin-vermittelten Phagozytose (Hamid et al., 1999). Der Integrin-rezeptor hat ausserdem im Zusammenspiel mit dem Aktin-Zytoskelett die Aufgabe, die Zelle an der extrazellulären Matrix zu befestigen (Clarc et al., 1995). Dies könnte einer der Gründe sein, weshalb YopH-Monosekretionsmutanten sich nicht mehr in mesenterialen Lymphknoten ansiedeln können (Logsdon et al., 2003).

1.3.5 YopO/ YpkA

Das 81,7 kDa große Protein YopO (*Y. enterocolitica*) und sein Homologes YpkA (*Yersinia protein kinase A*, *Y. pseudotuberculosis*) sind in der Lage, eigene Serinreste zu autophosphorylieren (Galyov et al., 1993). N-terminal trägt YopO 11 Domänen, die Ähnlichkeit zu eukaryotischen Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinasen haben (Galyov et al., 1993; Hanks et al., 1991). *In vitro* Experimente zeigen, dass rekombinantes YopO alleine keine Kinase-Aktivität besitzt, bis durch Zugabe von HeLa-Lysat der eukaryotische Aktivierungsfaktor Aktin hinzukommt (Barz et al., 2000; Juris et al., 2000). Für die

Aktivierung der Kinase-Aktivität von YopO und die Interaktion mit Aktin wird der C-Terminus von YopO benötigt (Juris et al., 2000).

Maus-Infektionsversuche mit YopO/YpkA-Deletionsmutanten zeigen eine abgeschwächte bis fehlende Virulenz (Galyov et al, 1993). Bei Infektionen von Wildtyp-Yersinien in Konkurrenz zu YopO-Monosekretionsmutanten konnte sich die Monosekretionsmutante nicht weiter vermehren, während die Wildtyp-Yersinie weiterhin nachgewiesen werden konnte (Logsdon, 2003). YopO wird nur in geringem Maße in die Wirtszelle transloziert und ist in infizierten HeLa-Zellen an der Innenseite der Zellmembran zu finden. Dies legt den Verdacht nahe, dass sich auch Substrate von YopO dort befinden (Hakansson et al., 1996), bisher wurde jedoch noch kein Substrat von YopO gefunden welches *in vivo* phosphoryliert wird. Die *in vitro* gefundene Phosphorylierung von Aktin scheint aufgrund der großen Menge von Aktin in der Zelle *in vivo* eine weniger große Relevanz zu haben. Vermutet wird, dass YopO Proteine phosphoryliert, die für die Regulation des Aktin-Zytoskeletts der Zelle von Bedeutung sind, da es bei einer Überexpression von YopO zur Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts kommt (Juris et al., 2000). Morphologisch kommt es zur Abrundung infizierter HeLa-Zellen und Bildung von verzweigten Retraktionsfasern aber nicht zu einem Ablösen von der extrazellulären Matrix (Hakansson et al., 1996). Die Zytoskelettveränderungen könnten auf die Interaktion von YopO mit den kleinen GTPasen Rho A und Rac1 zurückzuführen sein, die an der Regulation der Aktindynamik in der Zelle beteiligt sind (Barz et al., 2000; Dukuzumuremyi et al, 2000).

1.3.6 YopT

YopT ist das zuletzt entdeckte Effektorprotein. Die Translokation von YopT in die Zelle erfordert das Vorhandensein des spezifischen YopT-Chaperons (Trülsch et al., 2003). Ähnlich wie YopE führt YopT zur Zerstörung des Zytoskeletts (Iriarte und Cornelius, 1998). Im Gegensatz zu YopE kann YopT nur Aktinstressfasern zerstören und hat keinen Einfluss auf andere Aktin-gekoppelte Zellstrukturen, wie z.B. Zell-Zell-Kontakte. Es konnte gezeigt werden, dass das zelluläre Substrat von YopT das kleine G-Protein Rho A ist. YopT verursacht eine kovalente Modifikation von Rho A, die zu dessen Inaktivierung führt (Zumbihl et al., 1999). Shao et al. konnten zeigen, dass es sich bei YopT um eine Cystein-Protease handelt, die den Geranylgeranyl-Cysteinrest am C-Terminus von Rho A abspaltet (Shao et al., 2002).

1.3.7 YopM

YopM ist entscheidend für die volle Virulenz von Yersinien im Mausinfektionsmodell. Mulder et al. konnten nachweisen, dass Mäuse, die mit einer YopM-Monodeletionsmutante infiziert wurden, 1-4 Tage länger überlebten als Vergleichstiere, die mit Wildtyp-Keimen infiziert worden waren (Mulder et al., 1989). Es konnte gezeigt werden, dass YopM essentiell ist für eine systemische Yersinien-Infektion. Oral zugeführte YopM-Monodeletionsmutanten konnten nur lokal in den Payer-Plaques nachgewiesen werden, jedoch nicht in Milz und Leber (Trülsch et al., 2004). Ausserdem konnte *in vivo* eine signifikante Verminderung von NK-Zellen (natural killer-Zellen) durch die Anwesenheit von YopM nachgewiesen werden (Kerschen et al., 2004).

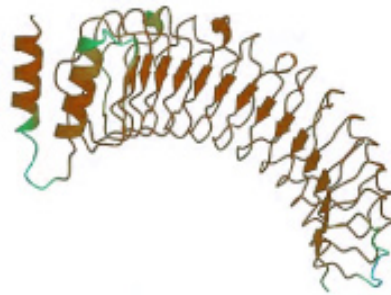


Abbildung 3: Ausschnitt aus der Struktur von YopM, modifiziert nach Evdokimov et al., 2001.

Strukturell besteht YopM (siehe Abb.3) aus einer N-terminalen Region und einer C-terminalen Region, die durch Leucin-reiche Wiederholungssequenzen (leucine rich repeats, LRR) miteinander verbunden sind. Die N-terminale Region ist für die Sekretion und Translokation notwendig (Boland et al., 1996) und besteht aus etwa 73 (Evdokimov et al., 2001) Aminosäuren. Der C-Terminus besteht aus etwa 24 AS (Evdokimov et al., 2001). Die zahlreichen Leuzin-reichen Wiederholungssequenzen sind unter Proteinen weit verbreitet (Kobe et al., 1994). Die Anzahl der LRRs variiert zwischen 13-20 LRRs mit einer Länge von je etwa 20 bzw. 22 Aminosäuren (Kobe et al., 2001). Die ersten drei N-terminal gelegenen LRRs und die letzten vier C-terminal gelegenen LRRs zeigen eine große Übereinstimmung zwischen den Spezies *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*. Die zentralen LRRs zeigen nur eine schwache Übereinstimmung zwischen den Spezies (Benabdillah et al., 2004). Über eine Interaktion der C-Termini und der C-terminalen LRRs kommt es zur Bildung von YopM-Dimeren. Zur Bildung von symmetrischen Tetrameren wickeln sich zwei Dimere umeinander. Die biologische Signifikanz der YopM-Tetramer-Bildung ist bisher unklar (Evdokimov et al., 2001). Je nach Anzahl der 13-20 LRRs kann YopM variable Größen haben und schwache Homologien zu einer Vielzahl von Proteinen aufweisen (Boland et al., 1998; Kobe et al., 1995). Die schwache Homologie zur α -Kette des Thrombozyten-Oberflächenproteins Glykoprotein1b (GP1b-a), das Thrombin und den von-Willebrand-Faktor bindet, führte zur Annahme, dass YopM extrazellulär durch Bindung an Thrombin wirkt (Leung et al., 1989). Da jedoch die Thrombin-bindende Domäne von GP1b außerhalb des zu YopM homologen Bereiches liegt und bis heute keine Thrombin-bindende Domäne auf YopM gefunden wurde, ist man von dieser Hypothese weitgehend abgerückt (Gralnick et al., 1994; De Marco et al., 1994). Nach neueren Erkenntnissen hat die Thrombinbindung von YopM für seine Virulenz im Mausmodell keine Bedeutung (Hines et al., 2001). Außerdem wurde YopM in der eukaryoten Zelle nachgewiesen (Boland et al., 1996). Die Translokation von YopM in die Zelle erfordert nicht das Vorhandensein des spezifischen YopM-Chaperons (Trülzsch et al., 2003). Immunfluoreszenzstudien an mit *Y. pestis* infizierten HeLa-Zellen zeigen, dass YopM nicht nur im Zytosol sondern auch nach 4h Infektionsdauer im Zellkern nachgewiesen werden kann (Skrzypek et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, daß entweder der N-Terminus mit den LRRs 1-3 oder der C-Terminus mit den LRRs 10-15 für den vesikulären Transport von YopM in den Zellkern notwendig sind (Skrzypek et al., 2003). Benabdillah et al. konnten zeigen, dass der C-Terminus mit oder ohne die LRRs 1-3 ausreicht, um YopM in den

Zellkern zu transportieren (Benabdillah et al., 2004).

Für die Virulenz scheinen die LRRs 4-10 von Bedeutung zu sein, denn *Y. pestis*-YopM-Mutanten ohne LRR 4-7 bzw. 7-10 sind im Maus-Infektionsmodell avirulent (Hines et al., 2001).

Die Lokalisation von YopM spricht dafür, dass der beobachtete virulente Effekt von YopM durch Interaktion mit intrazellulären Komponenten geschieht. Analysen von infizierten Makrophagen zeigen, dass YopM die Transkription verschiedener Gene reduziert, die mit Zellzyklus und Zellwachstum zusammenhängen. Unter ihnen ist das Gen von B-myb, ein Transkriptionsfaktor der das Wachstum von Blutzellen stimuliert (Sauvonnet et al., 2002). McDonald et al. konnten eine direkte Interaktion von YopM mit PRK2 (protein kinase C-like 2) und RSK1 (p90 ribosomal protein S6 kinase 1) nachweisen, die durch Interaktion mit YopM aktiviert werden (McDonald et al., 2003). Funktionelle Studien über das zytoplasmatische Protein PRK2 lassen darauf schließen, dass PRK2 eine Komponente in Signalwegen ist, die Einflüsse auf Zytoskelett, Translation und Zellüberleben haben (McDonald et al., 2003). RSK1 hat regulierende Einflüsse auf Zellproliferation, Translation und Zellüberleben. Es konnte gezeigt werden, dass RSK1 sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorhanden ist (McDonald et al., 2003).

Kaya et al. konnten im Affinitätsblot eine Interaktion *in vitro* von YopM mit der intrazellulären Cystein-Protease Calpain zeigen (Kaya et al., Kongressbeitrag 2001). Da Calpain als potentieller Interaktionspartner von YopM in dieser Arbeit *in vivo* untersucht wurde, soll an dieser Stelle näher auf die Cystein-Protease Calpain eingegangen werden.

1.4 Die Cystein-Protease Calpain

1964 wird zum ersten Mal von Guroff eine intrazelluläre, durch Calciumionen aktivierbare Protease beschrieben, die ihr Wirkoptimum bei neutralem pH-Wert besitzt (Guroff et al., 1964). 1981 führt Murakami den Begriff „Calpain“ ein für Calciumionen-abhängige, Papain-ähnliche Cysteinproteasen und „Calpastatin“ für deren endogenes Inhibitorprotein (Murakami et al., 1981). Calpaine sind in fast allen Zellen vorhanden und unter Organismen weit verbreitet (Potter et al., 1998). Die am besten charakterisierten und ubiquitär vorkommenden Calpainarten sind m-Calpain und μ -Calpain. Die Namen haben ihren Ursprung in der Menge an Calcium, die sie für ihre Aktivierung *in vitro* benötigen. Für die halbmaximale Aktivität benötigt m-Calpain 0,2-1mM Calcium und μ -Calpain 5-50 μ M Calcium (Suzuki et al., 1998). Frei verfügbare Calciumionen liegen im Zytoplasma in Konzentrationen kleiner als 1 μ M vor.

Die heterodimeren Enzyme (110kD) bestehen aus einer kleinen regulatorischen Untereinheit (30kD) und einer großen katalytischen Untereinheit (80kD). Während die 80kD Untereinheiten von μ -Calpain und m-Calpain vergleichbar aber nicht identisch sind, wird die 30kD Untereinheit als identisch angesehen. Unterschiede in der Calciumabhängigkeit sind demnach in den Unterschieden der großen Untereinheiten zu finden. Die komplette Sequenz der beiden Untereinheiten ist seit 1984 bekannt (Ohno et al., 1986; Sakihama et al., 1985). Wie in Abb.4 schematisch dargestellt, besteht die große Untereinheit aus vier Domänen D1, D2, D3 und D4 und die kleine Untereinheit aus den Domänen D5 und D6 (Johnson, 1990). Die N-terminale Domäne 1 besteht aus 19 Aminosäuren, die nach bzw. während der Aktivierung abgespalten werden. Domäne 2 ist eine Papain-ähnliche Cystein-Protease,

die wegen ihrer starken Konservierung auf eine unentbehrliche Funktion hinweist. Domäne 3 entspricht der regulatorischen Domäne, die Phospholipide binden kann und potentielle Phosphorylierungsstellen besitzt (Tomba et al., 2001). In den homologen Domänen 4 und 6 wurden je 5 mal eine EF-Hand gefunden, die Calcium binden kann. Eine EF-Hand ist auch in Domäne 3 zu finden. EF-Hände sind ein Strukturmotiv der Calmodulin-Familie Calcium-bindender Proteine. Sie bestehen aus einer Helix, einer verbindenden Polypeptid-Schleife, die das gebundene Calcium-Ion umgibt und einer weiteren Helix. EF-Hand-Strukturen sind von Calmodulin bekannt und auch bei anderen modulierenden Proteinen wie Troponin C, Frequenin und bei Calcium-Transportern wie Calbindin, Parvalbumin zu finden (Ikura et al., 1996). Domäne 5 ist reich an Glycin-Resten und damit ein hydrophober Abschnitt. Dieser Bereich soll mit membranverankerten Proteinen und Membranen Wechselwirkungen eingehen (Sann, 2000). In molekularbiologischen Untersuchungen konnten weitere große Untereinheiten von Calpain gefunden werden, die als organspezifisch angesehen werden, wie etwa nCL-2 (nCL= novel Calpain Large subunit) im Magen, Lp82 in der Augenlinse und nCL-1 (p94) im Skelettmuskel (Kinbara et al., 1998).

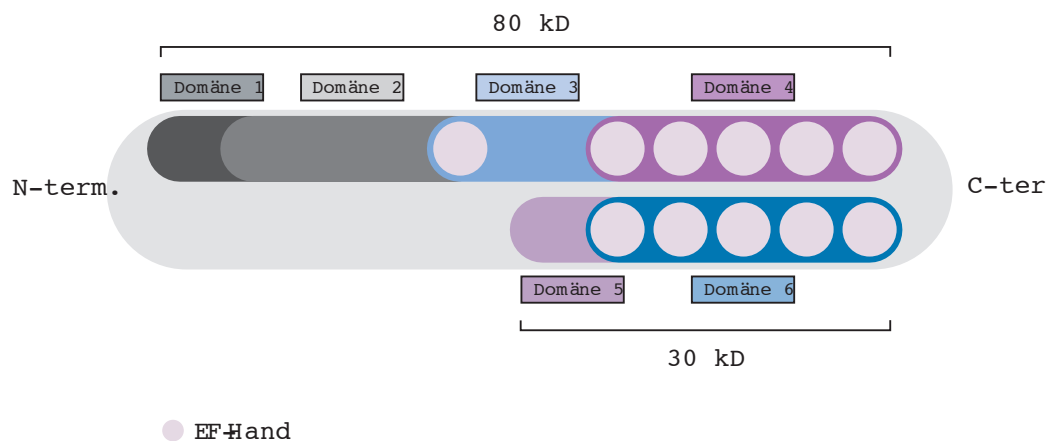


Abbildung 4:
Schematische Struktur der großen und kleinen Untereinheit von m- und μ -Calpain.

Obwohl die Struktur von Calpain entschlüsselt werden konnte, sind die Mechanismen von Aktivierung, Regulierung und Hemmung nur teilweise verstanden. Erst wurde vermutet, dass eine Aktivierung über einen intrazellulären Calciumeinstrom zustande kommt. Da die benötigten Calciumkonzentrationen für m-Calpain jedoch physiologisch unerreichbar sind müssen *in vivo* noch andere Mechanismen vorhanden sein. Als weitere Regulationsmöglichkeiten von Calpain wird neben der Menge an Calcium, der endogene Inhibitor Calpastatin, die Phosphorylierung von Calpain und dessen eigene Autodegradation diskutiert (Perrin et al, 2002). Die irreversible Autodegradation von Calpain scheint eine Regulierung der Protease zu ermöglichen. Bei Aktivierung von Calpain kommt es zur Autodegradation von etwa 19 Aminosäuren des N-Terminus der großen Untereinheit mit anschließender Dissoziation der beiden Untereinheiten. Die gekürzte Untereinheit besitzt katalytische Funktionen und benötigt eine niedrigere Calcium-Konzentration zur Aktivität (Suzuki et al., 1998; Baki et al., 1996). Die Dissoziation scheint aber nicht notwendig zu sein für die Proteaseaktivität *in vivo* (Nakagawa et al., 2001). Die Bindung von Phospholipiden an Calpain senkt den Bedarf an Calcium zur Aktivierung

durch Abspaltung des N-Terminus *in vitro* (Arthur et al., 1996). Vor kurzem wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von Calpain die Aktivität der Calpastatine beeinträchtigt (Glading et al., 2002). Calpastatine, endogene intrazelluläre Inhibitoren von Calpain, sind weit verbreitet, zellpermeabel und spezifisch für Calpain. Die genaue Wirkung ist bisher nicht bekannt (Maki et al., 1989). Auch die genauen physiologischen Funktionen von Calpain sind noch nicht eindeutig erforscht, lassen aber wegen des ubiquitären Vorkommens von Calpain wichtige Basisfunktionen vermuten. Diese Vermutung konnte durch transgene Mäuse, denen die regulatorische Untereinheit von Calpain fehlt, bestätigt werden. Sie starben nach 11 Tagen mit stagnierter Gefäßentwicklung; embryonale Stammzellen, Fibroblasten und die Organogenese waren nicht beeinträchtigt (Arthur et al., 2000). In embryonalen Fibroblasten konnte jedoch eine Veränderung vom Aktin-Zytoskelett, der Anordnung von Filopodien, der Verteilung der FA-Komplexe und der Proteolyse von Calpains Zielprotein Talin beobachtet werden (Dourdin et al., 2001). Diese Ergebnisse deuten auf einen Einfluss Calpains auf die endotheliale Zellproliferation, -migration und auf das Überleben von Zellen hin.

Da Calpain in bestimmten Integrin-abhängigen FA-Komplexen gefunden wurde, die gleich nach der Signalübertragung und noch vor der Aktivierung von Rac-1 gebildet werden, scheint Calpain ein wichtiger Faktor der Rac-Aktivierung zu sein (Bilowska et al., 2000). Diese FA-Komplexe sind verantwortlich für den Zusammenhalt von zellulärem Aktin-Zytoskelett mit der umgebenden extrazellulären Matrix. Gefundene Substrate von Calpain *in vivo*, wie Talin, Ezrin, FAK, Vinculin und pp60Src sind ebenfalls in diesen FA-Komplexen zu finden. Kommt es zur Calpain-vermittelten Proteolyse der genannten Substrate, lockern sich die FA-Komplexe und es kommt zu verminderter Zelladhärenz (Schoenwaelder et al., 1997). Ein Hinweis für die Calpain-vermittelte Proteolyse und Aktivierung des 60kD großen pp60Src in seine Fragmente (52 kDa und 47 kDa) ist, dass die Proteolyse von pp60Src durch den intrazellulären Inhibitor von Calpain Calpeptin inhibierbar ist (Oda et al., 1993). Die beschriebene verminderte Zelladhärenz kann auch in Rinderendothelzellen (BAE) nachgewiesen werden, vermittelt durch eine Calpain-abhängige Inaktivierung von Rho A (Kulkarni et al., 2002). Perrin et al. betonen, dass die Effekte von Calpain auf Migration und Zellausbreitung abhängig sind vom untersuchten Zelltyp. So kann der beobachtete Effekt bei Hemmung von Calpain sehr unterschiedlich ausfallen: während bei Endothelzellen die Möglichkeit zur Zellausbreitung gehemmt wird (Potter et al., 1998), werden bei CHO-Zellen fokale Adhäsionskomplexe stabilisiert, die Adhäsivität der Zellen erhöht und die Rate der Zellloslösungen erniedrigt (Huttenlocher et al., 1997; Perrin et al., 2002). Die Inhibition von Calpain durch Calpeptin in Thrombozyten führt zur Hemmung der Zellausbreitung: 30% der Zellen sind rund, unausgebreitet und besitzen keine Filopodien oder Lamellipodien mehr (Croce et al., 1999). Möglicherweise sind einige Effekte Calpains seinem aktivierten Substrat Talin zuzuordnen. Talin ist ein Aktin-bindendes Protein, das Integrine mit dem Aktin-Zytoskelett verbindet, und somit wichtige Kontrollfunktionen über die Zelladhäsion ausüben könnte (Yan et al., 2001). Das intakte Talin (230 kDa) wird etwa 15sec nach Calpainaktivierung durch Calpain gespalten in ein C-terminales 190 kDa- und ein 47 kDa großes N-terminales Fragment (Hayashi et al., 1999). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Talin mit fokalen Adhäsionskomplex-Proteinen (FAP) wie Vinculin und Aktin interagiert und konnte mit β 1- und β 2-Integrinen koimmunopräzipitiert werden (Yan et al., 2001).

Calpain wird im Zusammenhang mit vielen Krankheiten genannt wie z.B. Myocardinfarkt (Tolnai et al., 1987; Bolli et al., 1983) und Diabetes mellitus Typ 2 (Haddad et al., 2002).

Perrin et al. beschreiben Calpain und seine Substrate als mögliche zukünftige Ziele von therapeutischen Interventionen bei Krebs und Chronischen Entzündungen. Durch Hemmung der Calpainaktivität reduziert sich die Invasivität der Zellen (Behandlung von Krebs) und deren migrative Fähigkeiten (Behandlung von chronischen Entzündungen) (Perrin et al., 2002). Diese Eigenschaften machen Calpain zu einem interessanten Thema aktueller Forschung.

1.5 Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte die Wirkung von YopM auf Yersinia-Zielzellen untersucht werden.

Für die Untersuchungen wurden Thrombozyten aus folgenden Gründen als Zielzelle gewählt:

Neben dem Nachweis von Yersinien-Thrombozyten-Aggregaten in den Kapillaren von mit Yersinien infizierten Mäusen (Simonet et al., 1990) konnte durch den Einfluss von Yersinien eine Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten nachgewiesen werden (Simonet et al., 1992). Mittels Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass Yersinien durch Thrombozyten aufgenommen werden (Simonet et al., 1992). Leung et al. konnten eine Homologie von YopM zu auf Thrombozyten lokalisiertem GPIIb-3 nachweisen (Leung et al., 1989). Da Thrombozyten keinen Zellkern besitzen, kann die Interaktion von YopM mit Thrombozyten ohne Überlagerung mit ablaufenden Translations- und Transkriptionsvorgängen untersucht werden.

Da YopM im Kern von HeLa-Zellen nachgewiesen werden konnte (Skrzypek et al., 1998), sollte auch die Interaktion von Yersinien mit HeLa-Zellen untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Materialien

Tabelle 1:

Gerät	Hersteller / Typ
Blotsystem	Amersham, Hoefer, Mighty small; Hoefer SE 400 Sturdier vertical units, www.amershamsciences.com
Brutschränke	Heraeus, BBD 6220, Hanau, Deutschland
CCD-Kameras	Leica, Leitz DM RD Olympus, Deutschland
Deckgläser 12mm	Hartenstein, Deutschland, www.laborversand.de
DNA-Elektrophoresekammer	Biometra®, Agagel, Göttingen, Deutschland
Elektroporationsgerät	BioRad, Gene Pulser II, München, Deutschland
Elektroporationsküvetten	Invitrogen, Paisley, Schottland
Entwicklungsgerät	Fuji, FPM-100A
Exponierkassette, X-ray	Kisker, Steinfurt, Deutschland, www.kisker-biotech.com
Fluoreszenzmikroskope	Leica, Leitz DM RBE Olympus BX 61, Deutschland
French Press	SLM-AMINCO, Spectronic Instruments, French Press® Pressure Cells (Typ 40K Manual-Fill-Cell, FA-030) und Cell Prewss, New York, USA
Gelddokumentationssystem	Herolab, E.A.S.Y.
Glasmaterialien	Schott
Graphik-Tablett	Wacom-board, Wacom, Amerika
Heizblock	Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Küvetten	1,5ml halbmikro, Brand, Wertheim, Deutschland
Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Axiovert 25, Deutschland
Magnetthermorührer	KikaWerke, RCT basic, Staufen, Deutschland
Mikroskopie-Dokumentations-Software	Cell^p, Olympus, Amerika Spot TM, Diagnostic Instrument Inc., Amerika
Nitrocellulosemembran Protran BA85	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Objektträger	Matrand, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Parafilm	Hartenstein, Deutschland, www.laborversand.de , www.parafilm.de
pH-Meter	Mettler Toledo, InLab 414
Photometer	Pharmacia Biotech, Ultrospec 3000
Plastikwaren	Falcon
PVDF-Membran	Millipore, Bedford, MA, www.millipore.com
Röntgenfilm	Fuji, Super RX
Schüttelinkubator	Certomat BS-1 B.Braun Biotech International, Osterode am Harz, Deutschland
Spannungsgerät	BioRad, Power Pac 200, München, Deutschland
Sterilfilter	Josef Peske oHG, Medizintechnischer Laborbedarf, Aindling-Pichl, Deutschland
Sterilwerkbank	Heraeus, HS12, Hanau, Deutschland
Thermocycler	Whatman, Biometra T3, Göttingen, Deutschland
Thermoschüttler	Eppendorf, Thermomixer Compact, Hamburg, Deutschland

Gerät	Hersteller / Typ
Transferapparatur	Amersham, Hoefer, TE 22 Mini Tank Transphor Unit; Roth, Maxi Semi-Dry-Blot, www.Carl-Roth.de
Ultrazentrifugations-Gefäße	Microfuge ®Tube, Beckman Instruments, Inc, CA, U.S.A.
Vakuum-Trockner	Kartell
Vortex-Gerät	Scientific Industries, Vortex-2 Genie
Waagen	510 Kern, Albstadt, Deutschland; Sartorius Feinwaage, Deutschland
Wasserbad	GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Whatman Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5417R, Hamburg, Deutschland; Eppendorf mini spin plus, Hamburg, Deutschland Sigma, 3K30, B.Braun Biotech International, Osterode am Harz, Deutschland Varifuge 3.0R, Heraeus Sepatech

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2:

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid-Mix / Protogel	National Diagnostics, Atlanta, USA
Agarose	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland, www.sigmaaldrich.com
Ammoniumpersulfat (APS)	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Ammoniumsulfat	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Ampicillin	Fuca / SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Bacto-Agar	DIFCO Laboratories, Detroit, USA
Bromphenolblau	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Bovines Serum-Albumin (BSA), Fraktion 5	BIOMOL, Hamburg, Deutschland
Calcium-Ionophor A23187	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Calpeptin	Calbiochem, La Jolla, CA, www.calbiochem.com
Chemilumineszenz Substrat	SuperSignal® West Pico, PIERCE, Rockford, Irland
Chloramphenicol	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue	BIOMOL, Hamburg, Deutschland
Cycloheximid	Calbiochem, La Jolla, CA, www.calbiochem.com
DMSO	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
DNA-Längenstandard (1kb plus)	Invitrogen, Paisley, Schottland
DTT	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
EDTA	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
EGTA	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Ethanol absolut	Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Fibrinogen	Enzyme Research Laboratories, S. Lafayette, USA, www.enzymeresearch.com
Formalin	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Glukose	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Glycerin	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn bei München, Deutschland
Glycin	E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Isoamylalkohol	E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland
LB-Broth	MO BIO Laboratories, Inc. Dianova, Hamburg, Deutschland
Leupeptin	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
<i>β-Mercaptoethanol</i>	<i>Merck-Schuchardt, Hohenbrunn bei München, Deutschland</i>
<i>Methanol</i>	<i>Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland</i>
<i>Moviol</i>	<i>SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland</i>
<i>Natriumacetat</i>	<i>E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland</i>
<i>Natriumchlorid</i>	<i>E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland</i>
<i>Natriumdihydrogenphosphatdihydrat</i>	<i>E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland</i>
<i>Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat</i>	<i>E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland</i>
<i>Natriumhydroxid-Plätzchen</i>	<i>E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland</i>
<i>DNTP</i>	<i>Invitrogen, Paisley, Schottland</i>
<i>Penicillin</i>	<i>Invitrogen, Paisley, Schottland</i>
<i>Pepstatin</i>	<i>SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland</i>
<i>Phenol</i>	<i>E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland</i>
<i>PMSF</i>	<i>Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland</i>
<i>PEG₄₀₀₀</i>	<i>MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland</i>
<i>Poly-L-Lysin</i>	<i>SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland</i>
<i>Ponceau S</i>	<i>SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland</i>
<i>Protease-Inhibitor-Tabletten</i>	<i>Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland</i>
<i>Protein A-Agarose</i>	<i>Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland</i>
<i>Proteingrößenstandard</i>	<i>Invitrogen, Paisley, Schottland; SIGMA-Aldrich, Deutschland</i>
<i>Rhodamin-Phalloidin</i>	<i>Molecular Probes</i>
<i>RPMI 1640, Kultivierungsmedium</i>	<i>Invitrogen, Paisley, Schottland</i>
<i>Salzsäure</i>	<i>E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland</i>
<i>SDS</i>	<i>SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland</i>
<i>Streptomycin</i>	<i>Invitrogen, Paisley, Schottland</i>
<i>TEMED</i>	<i>E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland</i>
<i>Thrombin</i>	<i>SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland</i>
<i>TransFectinTM Lipid Reagent</i>	<i>BioRad, Kalifornien, USA</i>
<i>Tris Ultra Pure</i>	<i>ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA</i>
<i>Triton X-100</i>	<i>SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland</i>
<i>Trypanblau</i>	<i>SERVA, Heidelberg, Deutschland</i>
<i>Trypsin / EDTA</i>	<i>Invitrogen, Paisley, Schottland</i>
<i>Tryptophan</i>	<i>SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland</i>
<i>Tween 20</i>	<i>SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland</i>
<i>Zymosan A</i>	<i>SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland</i>

2.1.3 Kit-Systeme

Tabelle 3:

Bezeichnung des Kit-Systems	Hersteller
<i>ExoIII / S1-Deletion Kit</i>	<i>MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland</i>
<i>Plasmid Midi-Kit</i>	<i>QIAGEN, Hilden, Deutschland</i>
<i>Plasmid Mini-Kit</i>	<i>QIAGEN, Hilden, Deutschland</i>
<i>Qiagen Nukleotide Removal-Kit</i>	<i>QIAGEN, Hilden, Deutschland</i>
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	<i>QIAGEN, Hilden, Deutschland</i>
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	<i>QIAGEN, Hilden, Deutschland</i>
<i>Quick-Change Site Directed Mutagenesis Kit</i>	<i>Stratagene, La Jolla, CA</i>
<i>TA-Kloning-Kit</i>	<i>Invitrogen, Paisley, Schottland</i>

2.1.4 Antikörper (AK)

Tabelle 4:

Primäre AK	Spezifität	Isotyp und Herkunft	Hersteller	Arbeits-Verdünnung	Referenz
Anti-Calpain	Gegen Calpain (80kD) und dessen Fragmente beo 78kD, 76kD, 40kD	Kaninchen	Fr. Dr. Geiger, LMU München, Klinische Chemie	10µg/ml	Fr. Dr. Geiger, LMU München, Klinische Chemie
Anti-HA (Y-11)	Gegen eine interne Region von Hämagglutinin des Influenza Virus gerichtet	IgG, Kaninchen, polyklonal	SantaCruz Biotechnology, Inc., www.scbt.com	1 :5000 IFT: 1:50	Maniattis, T. et al., 1982

Sekundäre AK/ Art der Detektion	Spezifität	Isotyp/Herkunft	Hersteller	Referenz
Anti-mouse / POX	Gegen IgG aus Maus gerichtet, FITC markiert	Polyklonales Serum aus Ziege	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland	Wilson, M., and Nakane, P., 1978
Anti-rabbit / POX	Gegen IgG aus Kaninchen gerichtet, FITC markiert	Polyklonales Serum aus Ziege	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland	Voller, A. et al., 1976

2.1.5 Enzyme

2.1.5.1 Restriktionsenzyme

Tabelle 5:

Enzym / Konzentration	Puffer	Temperaturoptimum	Vertreiber
Hind 3	React 2	37 °C	GIBCO BRL®LIFE TECHNOLOGIES, Paisley, Schottland

2.1.5.2 DNA-Polymerasen

Tabelle 6:

Enzym / Konzentration	Temperaturoptimum	Anmerkung	Firma
Klenow-Fragment (3U/µl)	37 °C		GIBCO BRL®LIFE TECHNOLOGIES, Paisley, Schottland
Pfu-Polymerase (2,5U/µl)	68 °C	3' → 5'-Exonuklease-Aktivität	Stratagene, La Jolla, CA
Taq-Polymerase (5U/µl)	72 °C		MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland

2.1.5.3 Weitere Enzyme

Tabelle 7:

Enzym	Puffer	Temperaturoptimum	Firma
Bakterielle Alkalische Phosphatase (1U/ μ l)	10xDephosphorylierungs-Puffer	65 °C	Invitrogen, Paisley, Schottland
Exonuklease III (200U/ μ l)	10xExoIII Puffer bzw. B ⁺ , G ⁺ und Y ⁺ / Tango tm -Puffer	25°C – 45°C	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Lysozym	STET pH = 8	RT	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
PreScission-Protease (2U/ μ l)	1xPBS	4°C	Amersham Bioscience, Piscataway, USA
RNase I (6U/ μ l)	10xReaktionspuffer	37 °C	Promega, Madison, U.S.A.
S1-Nuklease (17U/ μ l)	7,4xS1-Puffer	RT	MBI Fermentas, St.Leon-rot, Deutschland
T4-DNA-Ligase (5U/ μ l)	10xReaktionspuffer	RT	MBI Fermentas, St.Leon-rot, Deutschland
T4-DNA-Ligase (5U/ μ l)	5xReaktionspuffer	RT	GIBCO BRL®LIFE TECHNOLOGIES, Paisley, Schottland
Thrombin-Protease (1U/ μ l)	1XPBS	20°C	Amersham Bioscience, Piscataway, USA

2.1.6 Nährmedien

Tabelle 8:

Nährmedien für Bakterien	Zusammensetzung
LB-Medium	Sambrook et al.,1989; Für Platten wurden 1,5% Bacto-Agar zugesetzt ; Autoklaviert; Je nach Resistenz der kultivierten Stämme wurden folgende Antibiotika in den angegebenen Endkonzentrationen zugegeben : Ampicillin 100 μ g/ml Chloramphenicol 20 μ g/ml Spectinomycin 50 μ g/ml

Zellkultur	
DMEM	10% FCS; 200U/ml Penicillin; 200 μ g Streptomycin
Einfriermedium	10% DMSO; 20% FCS; 70% Basalmedium (RPMI oder DMEM)
RPMI 1640	10% FCS; 200U/ml Penicillin; 200 μ g Streptomycin
Trypsin / EDTA	0,05% Trypsin; 0,02% EDTA; in PBS pH 8,0

2.1.7 Plasmide/ Vektoren

Tabelle 9:

Name	Größe	Hersteller	Resistenzen / Auxotrophien
pACYC184	4,244 kb	Stratagene, La Jolla, CA	Chloramphenicol

2.1.8 Bakterienstämme

2.1.8.1 *Escherichia coli*-Stämme

Tabelle 10:

Bezeichnung	Genotyp	Resistenz
DH5- α	F^- endA1 hsdR17 (r_k^- , m_k^+) supE44 thi-1 λ^{-1} recA1 gyrA96 recA1 gyrA96 relA1 Φ 80d lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF ^g) U169 Bemerkung : LacZ-negatives Derivat von DH5, dam ⁺	--
DH5- α mit pACYC-Wt-YopM 0:8	DH5-a mit pACYC-Plasmid für die Produktion von YopM-Wt., Serotyp 0:8	Chloramphenicol

2.1.8.2 *Yersinia enterocolitica*-Stämme

Tabelle 11:

Yersinia-Stämme	Genotyp	Resistenz
WA-P	Serotyp 0:8 mit dem gesamten Virulenzplasmid	--
WA-C	Serotyp 0:8 ohne Virulenzplasmid (C=cleared)	--
WA-C(pTTSS)	Dieser Stamm trägt das Lcr-Plasmid (mit Spektinomycin-Resistenzkassette; Typ-III-Sekretionsapparat; Adhäsine Yad A).	Spektinomycin
WA-C(pTRANS, pCJYE)	Dieser Stamm trägt neben dem Lcr-Plasmid (mit Spektinomycin-Resistenzkassette; Typ-III-Sekretionsapparat; Adhäsine Yad A) noch ein pACYC-Plasmid (mit Chloramphenicol-Resistenz) für die Produktion von YopE-Wt.	Chloramphenicol, Spektinomycin
WA-C(pTRANS, pCJYE138-YO)	Dieser Stamm trägt neben dem Lcr-Plasmid noch ein pACYC-Plasmid für die Produktion von YpkA/YopO und die ersten 138 AS von YopE (u.a. YopE-Promotor).	Chloramphenicol, Spektinomycin
WA-C(pTRANS, pCJYM)	Dieser Stamm trägt neben dem Lcr-Plasmid noch ein pACYC-Plasmid für die Produktion von YopM-Wt., Serotyp 0:8	Chloramphenicol, Spektinomycin
WA-C(pTRANS, pCJYE138-YP)	Dieser Stamm trägt neben dem Lcr-Plasmid noch ein pACYC-Plasmid für die Produktion von YopP und die ersten 138 AS von YopE (u.a. YopE-Promotor).	Chloramphenicol, Spektinomycin
WA-C(pTRANS, pCJYM0:9)	Dieser Stamm trägt neben dem Lcr-Plasmid noch ein pACYC-Plasmid für die Produktion von YopM-Wt., Serotyp 0:9	Chloramphenicol, Spektinomycin
WA-C(pTRANS, pCJYH)	Dieser Stamm trägt neben dem Lcr-Plasmid noch ein pACYC-Plasmid für die Produktion von YopH	Chloramphenicol, Spektinomycin
WA-P(Δ YM)	Serotyp 0:8 mit dem gesamten Virulenzplasmid außer YopM	Kanamycin
WA-P(Δ YE)	Serotyp 0:8 mit dem gesamten Virulenzplasmid außer YopE	Kanamycin
WA-P(Δ YO)	Serotyp 0:8 mit dem gesamten Virulenzplasmid außer YopO	Kanamycin
WA-P(Δ YT)	Serotyp 0:8 mit dem gesamten Virulenzplasmid außer YopT	Kanamycin
WA-P(Δ YH)	Serotyp 0:8 mit dem gesamten Virulenzplasmid außer YopH	Kanamycin

2.1.9 Eukaryote Zelllinien

Tabelle 12:

Bezeichnung	Zelltyp
HeLa-Zellen	Humane Epithelzellen; Cervix-Karzinom-Zelllinie
Thrombozyten	Frisch gewonnene humane Blutplättchen

2.1.10 Oligonukleotide für PCR und Sequenzierungen

Tabelle 13:

Herkunft: Metabion, www.metabion.de;Oligonukleotide mit Überlapp: herkunft: Thermohybaid, www.thermohybaid.de

Bezeichnung / RE	Sequenz / T _M	Bindungsstelle
YopM-HA-Tag-Primer		
YopMHind3	5'-CCTTCAATGGTAGAAGAGCTA-3' / 74°C	Promotorbereich YopM
HAHind3	5'-ATATA/AAGCTT/CTA/ AGCGTAATCTGGAAC ATCATATGGGTA/ CTCAAAAACATCATCTTCAAGTTTGTC-3' / 72°C	unspez.Ende-/ Hind3-/ Stop-/ HA-Tag- Überlapp/, bindet dann an YopM mit 27 Basen
YopM-Sequenzierung-Primer		
Seq1	5'-CAGCCCCATACGATATAAGTT-3' / 60°C	pACYC-Vektor 5'
Seq2	5'-ACGGTGCCTGACTGCGTT-3' / 58°C	pACYC-Vektor 3'
YopMMitte	5'-GCATTAGAGAGGTTAGT-3' / 50°C	im YopM-Strang
YopM-Deletions-Primer		
YopMHind3	5'-CCTTCAATGGTAGAAGAGCTA-3' / 74°C	Promotorbereich YopM
YopM _{Δ1506-1578} -HA	5'-ATATA/AAGCTT/CTA/ AGCGTAATCTGGAACATCATATGGGTA/ AGAGTCCATCCGAAGATCTTCCACT-3' / 74°C	unspez.Ende-/ Hind3-/ Stop-/ HA-Tag- Überlapp/, bindet dann an YopM mit 25 Basen
YopM-Deletions-Sequenzierung-Primer		
Seq1	5'-CAGCCCCATACGATATAAGTT-3' / 60°C	pACYC-Vektor 5'

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Anzucht von Yersinien und *E. coli*

Ein Erlenmeyerkolben wird so gewählt, dass das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen möglichst groß ist, um eine gute Sauerstoffversorgung der Yersinien zu sichern. In den Erlenmeyerkolben werden 10ml LB-Medium und, je nach Resistenz der Yersinie, Antibiotika gegeben. Mit einer Impföse wird eine Kolonie gepickt und damit die Kultur beimpft. Diese wird über Nacht bei 27°C (*Yersinia*) bzw. 37°C (*E. coli*) im Inkubator geschüttelt. Für Infektionsversuche (*Yersinia*) wird am folgenden Tag eine 1:20-Verdünnung mit LB-Medium hergestellt und für 2h unter Schütteln bei 37°C im Inkubator gelassen.

LB-Medium: 25g LB-Broth/ 1 H₂O

2.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Bakterienkulturen

Die Bestimmung der Zellzahl (optische Dichte) einer Bakterienkultur erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 600nm. Die Absorption der Zellen wird gegen den Leerwert des reinen Mediums bei einer Wellenlänge von $\lambda=600$ gemessen. Die OD von 0,36 entspricht einer Bakterienzahl von ca. 1×10^9 Zellen/ml. Um in der Bakterienprobe die gewünschte Keimkonzentration einzustellen, wird berechnet, wieviel Medium noch zur Probe dazugegeben werden muss.

2.2.1.3 Ausplattieren von Bakterien

Der erhitzte Agar wird auf etwa 50°C abgekühlt, die für den jeweiligen Bakterien-Stamm benötigten Antibiotika dazugegeben und in Platten gegossen. Von einer geeigneten Verdünnung der Bakteriensuspension werden 100-200 μ l auf dieser Agarplatte mit einem abgeflammt und abgekühlten Glasspatel gleichmäßig verteilt. Nach dem Antrocknen werden die Platten bei 27°C (Yersinien) bzw. 37°C (*E. coli*) im Brutschrank inkubiert. Nach 24 Stunden sind Einzelkolonien zu erkennen, die ggf. gezählt werden können.

LB-Agar: 12,5g LB-Broth, 7,5g Bactoagar pro 500ml H₂O

2.2.1.4 Lagerung von Bakterien

Die bewachsenen Agarplatten werden mit Parafilm abgedichtet und können so im Kühlschrank bei 5°C für etwa 4 Wochen gelagert werden. Danach sollten entweder neue Bakterien ausplattiert, oder eine alte Kolonie auf neue Platten überimpft werden. Nahezu unbegrenzt überleben Yersinien- und *E. coli*-Stämme als Glycerinkulturen (15% Glycerin) bei -80°C und können bei Bedarf aufgetaut werden.

2.2.1.5 Sezernierte Proteine aus Yersinien

Die Induktion des Yop-Regulons erfolgt in Annäherung an die von Heesemann (Heesemann et al., 1986) beschriebene Methode. In 20ml Endvolumen wird eine bei 27°C angezogene Übernachtskultur von *Y. enterocolitica* 1:20 verdünnt und bei 37 °C für 1,5h unter Schütteln inkubiert. Die Sekretion

der Yops wird durch Zugabe von MgCl_2 (Endkonzentration 15mM), EGTA (Endkonzentration 5mM, Komplexierung von Ca^{2+}) und Glukose (Endkonzentration 0,2%) und weiterer Inkubation bei 37°C für 2h unter Schütteln induziert. Die Zellen werden zentrifugiert (10min, 6800rpm, RT) und der Überstand (Yops) durch TCA (Trichloressigsäure) gefällt. Nach nochmaligem Zentrifugieren (10min, 15.000g, RT) wird das Pellet (Yops) in SDS-Puffer aufgenommen.

1x SDS-Puffer: 3% SDS, 0,6M Tris/ HCl pH 6,8; 10% Glycerin, 0,005% Bromphenolblau, 5% β -Mercaptoethanol

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung von humanen Zelllinien: HeLa-Zellen

RMPI 1640 Medium (Invitrogen) wird zunächst mit 10% hitzeinaktiviertem, fetalen Rinderserum und 5mM L-Glutamin versetzt. Dieses wird mit schnell aufgetauten HeLa-Zellen in eine große Zellkultur-Brutflasche (T-160) gegeben. Die Zellen werden bei 37°C, 5% CO_2 und 99%iger Luftfeuchtigkeit bebrütet. Beim Erreichen einer konfluenten Zelldichte (18×10^6) wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Um die Zellen von der Flasche zu lösen werden sie mit 1,5ml Trypsin/EDTA (Invitrogen) für 5min bei 37°C inkubiert. Dabei wird die Bindung der Zellen an den Untergrund über ihre Zelladhäsionsmoleküle gestört. Durch Zugabe von 9x Volumen Kulturmedium wird die Trypsinaktivität gestoppt und das zytotoxische EDTA gebunden. Die Zellen werden entweder 1:10 verdünnt in neue Brutflaschen ausgesät oder zum Experiment verwendet.

2.2.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl von HeLa-Zellen

Die Zahl lebender Zellen wird mit Hilfe der Neubauerzählkammer und Trypanblau bestimmt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der nur in tote Zellen diffundieren und diese anfärben kann. 30ml Zellsuspension werden mit 30ml Trypanblau (0,5% in PBS) versetzt. Durch Kapillarkräfte wird die mit Trypanblau versetzte Zellsuspension unter das Deckgläschen der Zählkammer eingesogen. Unter dem Mikroskop wird die Anzahl lebender, nichtgefärbter Zellen in vier Großquadranten bestimmt. Zellen, die auf den Begrenzungen der Großquadrate liegen, werden nur bei je zwei Außenkanten pro Quadrat berücksichtigt. Die Zellkonzentration wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Zellzahl/ ml} = \text{Mittelwert der 4 Großquadrate} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Die Gesamtzahl der isolierten Zellen ergibt sich aus dem Produkt der Zellzahl/ml und dem Volumen der Zellsuspension. Für die Immunfluoreszenz werden HeLa-Zellen in 24-well Mikrotiterplatten ausgesät und am folgenden Tag infiziert. Für andere Versuche werden sie kurz vor der Infektion von der großen Zellkultur-Brutflasche in kleine Eppendorf-Behälter umverteilt.

2.2.2.3 Infektion von HeLa-Zellen mit Yersinien

Die 1:20 verdünnte Yersinien-Übernachtskultur wird 2 Stunden bei 37°C im Inkubator geschüttelt, um die Produktion der plasmidkodierten virulenten Effektorproteine (Yops) zu induzieren. Dann

wird die Bakterienkultur zentrifugiert (1500g, 15 min, 4°C) und das Sediment in 2ml eiskaltes PBS aufgenommen. Die OD₆₀₀ einer 1:10-Verdünnung gegen den Leerwert (PBS) wird bestimmt und auf die Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ μ l eingestellt (siehe 2.2.1.2). HeLa-Zellen werden mit den angegebenen Yersinien-Stämmen in der jeweils angegebenen MOI, z.B. in einem Verhältnis von einer Zelle/30 Bakterien (MOI (multiplicity of infection) = 1:30), für die jeweils angegebene Zeitdauer bei 37°C inkubiert. Werden HeLa-Zellen in 24-well Mikrotiterplatten infiziert, so werden die Platten nach der Zugabe der Bakterien für 5min, 1200rpm bei RT zentrifugiert.

2.2.2.4 Aufreinigung von humanen Thrombozyten

Frisch gewonnene menschliche Thrombozyten werden vom Blutspendedienst konzentriert, gezählt und im Labor nach dem Protokoll von McNicol (Watson et al, 1996) aufgereinigt. Dazu werden 10ml der Thrombozyten mit 100 μ l 0,5M EDTA vermischt und zentrifugiert (1500g, 15min, 28°C), zwei Mal das Pellet in je 10ml Puffer 3 (RT) aufgenommen, vorsichtig vermischt und dazwischen zentrifugiert (s.o.). Puffer 3 enthält sowohl Citrat als auch EDTA und eignet sich von daher hervorragend als Waschpuffer bei großen Mengen von Thrombozyten. Das Pellet wird in die nach der gewünschten Thrombozytenzahl berechnete Menge Modified Tyrodes Buffer (MTB) aufgenommen.

Puffer 3: 90mM NaCl, 5mM KCl, 36mM Na₃Citrate, 10mM Na₂EDTA, 5mM Glucose, pH 6,5

MTB: 10mM Hepes, 12mM NaHCO₃, 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 5mM Glucose, pH 7,5

2.2.2.5 Inkubation von Thrombozyten mit Yersinien

Die 1:20 verdünnte Yersinien-Übernachtkultur wird 2 Stunden bei 37°C im Inkubator geschüttelt, um die Produktion der plasmidkodierte virulenten Effektorproteine (Yops) zu induzieren. Dann wird die Bakterienkultur zentrifugiert (1500g, 15 min, 4°C) und das Sediment in 2ml eiskaltes PBS aufgenommen. Die OD₆₀₀ einer 1:10-Verdünnung gegen den Leerwert (PBS) wird bestimmt und auf die Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ μ l eingestellt (siehe 2.2.1.2). Aufgereinigte Thrombozyten (siehe 2.2.2.4) werden mit den angegebenen Yersinien-Stämmen in der jeweils angegebenen MOI, z.B. in einem Verhältnis von einer Zelle/30 Bakterien (MOI = 1:30), für die jeweils angegebene Zeitdauer bei 37°C inkubiert.

2.2.3 Mikroskopische Methoden

2.2.3.1 Immunfluoreszenz (IFT)

Autoklavierte runde Deckgläschen werden in eine 24-well Mikrotiterplatte gelegt und für Thrombozytenversuche mit je 200 μ l Poly-L-Lysin benetzt. Nach etwa 3h werden diese je dreimal mit PBS gewaschen. Die jeweils gesamte inkubierte Probe wird auf je ein Deckgläschen pipettiert, anzentrifugiert (1500rpm, 5min, 28°C) und für die angegebene Zeitdauer bei 37°C inkubiert. Für HeLa-Zell-Versuche werden am Abend vor dem Versuch die benötigte Menge HeLa-Zellen auf Deckgläschen pipettiert, damit sie ü.N. adhären. Am folgenden Tag werden in der jeweils angegebenen MOI (multiplicity of infection) Bakterien dazu gegeben (Inkubation) und für die angegebene Zeitdauer bei 37°C inkubiert. Zum Fixieren wird der Überstand abgenommen und das

Deckgläschen mit je 500µl Fixations-Puffer benetzt. Die Mikrotiterplatte bleibt 30min bei RT stehen bis der Fixations-Puffer abgenommen und die Probe 5min mit Permeabilisations-Puffer permeabilisiert wird. Bei Verwendung von zwei Antikörpern wird im Anschluß 30min. bei Raumtemperatur mit Block-Puffer geblockt. Der Farbstoff Rhodamin-Phalloidin (Verdünnung von 1:100 in Waschpuffer und evtl. ein Antikörper) wird in einer feuchten Kammer 60min bei RT auf den Deckgläschen inkubiert. Phalloidin, ein Toxin des Knollenblätterpilzes, lagert sich spezifisch in fibrilläres (F-) Aktin ein. Die Kopplung an den Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin ermöglicht die Beobachtung der F-Aktinstrukturen im Fluoreszenzmikroskop. Dann wird 2x kurz und 3x je 10min bei RT mit Waschpuffer gewaschen und ggf. ein zweiter Antikörper verwendet. Die Deckgläschen werden mit den Zellen nach unten auf mit 6µl Moviol betropfte Objektträger gegeben und mit Nagellack fixiert. Die Präparate sollten im Dunkeln bei 4°C gelagert werden und sind so einige Zeit haltbar.

Die zur Anregung von Rhodamin benötigte Wellenlänge beträgt $\lambda=555\text{nm}$. Angeregtes Rhodamin emittiert Licht einer Wellenlänge von $\lambda=580\text{nm}$ und erscheint demnach rot. Die Mikroskopie der Präparate erfolgt mit einem Leica DM Fluoreszenz-Mikroskop. Zur Dokumentation wird eine CCD-Kamera und die Software SpotTM (Version 1.1.02 für Windows 3.1) von Diagnostic Instruments Inc. verwendet.

10x PBS: 8,10mM Na_2HPO_4 , 1,47mM NaH_2PO_4 , 137mM NaCl, 2,68mM KCl; pH 7,2

Waschpuffer: 1x PBS, 0,2% Triton-X-100

Fixations-Puffer: 3mM MgCl_2 , 60mM Pipes, 25mM Hepes, 10mM EGTA, 3,7% Formalin

Permeabilisations-Puffer: 1x PBS, 0,2% Triton-X-100

Block-Puffer : 1x PBS, 0,2% Triton-X-100, 4% Serum

Moviol: hergestellt nach Heimer and Taylor (1974)

2.2.3.2 Morphologische Differenzierung und Flächenmessung von Thrombozyten

Die wie in Kapitel 2.2.3.1 hergestellten Präparate werden mit dem Mikroskop Olympus BX 61 mikroskopiert. Für die morphologische Differenzierung der Thrombozyten werden von drei Versuchen, die an unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden, je 100 sich nicht berührende uninfizierte bzw. mit Yop-Monosekretionsmutanten inkubierte Thrombozyten mikroskopiert und ausgezählt. Wenn ein Thrombozyt über einem anderen liegt, so kann er nicht vollständig adhären (Allen et al., 1979), aus diesem Grund werden nur sich nicht berührende Thrombozyten ausgemessen. Als Charakteristika werden Abrundung von Thrombozyten, Filopodien- und Lamellipodienbildung gewählt, da diese bei der Ausbreitung von Thrombozyten von Croce et al. (Croce et al., 1999) beschrieben werden. Filopodien sind in dieser Auswertung analog zu Potter et al. (Potter et al., 1998) definiert als periphere Aktinmikroausläufer. Lamellipodien sind analog zu Potter et al. definiert als konvexe aktinhaltige Strukturen an der Zellgrenze, die auf eine Ausbreitung der Zelle hinweisen. Der Begriff Abrundung steht, angelehnt an Croce et al. (Croce et al., 1999), für unausgebreitete Thrombozyten, die weder Filopodien noch Lamellipoden vorweisen. Die Häufigkeit der einzelnen Morphologien wird tabellarisch und graphisch aufbereitet. Der simultane Einfluß der Monosekretionsmutanten und des Versuchsansatzes auf die Morphologie wird mit Hilfe eines multivariaten Verfahrens

untersucht. Aufgrund der polytomen Zielgröße wird das Baseline-Category Logit Model verwendet. Als Referenz zur Zielgröße Morphologie dient die Ausprägung Abrundung. Bei der polytomen Einflußgröße Monosekretionsmutante fungiert YopP als Referenz, beim Versuchsansatz Versuch 1. Der gesamte Einfluß der Monosekretionsmutante bzw. des Versuchsansatzes wird anhand des Wald-Tests ermittelt. Für jeden Meßzeitpunkt (5min, 15min und 45min) wird ein separates Modell gerechnet. Das Signifikanzniveau wird auf $\alpha=0,05$ festgelegt. Durchgeführt wird die Analyse mit dem Statistik Softwarepaket SAS (Statistical Analysis System, Release 8.2).

Für die Flächenmessung der Thrombozyten werden die Zellen fotografiert und die Thrombozytenkonturen händisch mit dem Wacom-board in der Software cell[^]p markiert. Es werden von drei Versuchen, die an unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden, je 100 uninfierte bzw. mit Yop-Monosekretionsmutanten inkubierte Thrombozyten ausgemessen. Die Konturen werden als tif-Dateien gespeichert. Die Software ermittelt aus der Größe der Konturen automatisch die Größe der Thrombozytenfläche. Die Mittelwerte der Thrombozytenfläche werden im Zeitverlauf tabellarisch und graphisch dargestellt, angelehnt an Croce et al. (Croce et al., 1999). Als Zeitpunkte werden 5min, 15min, 45min gewählt, da nach 5min die Adhäsion von uninfizierten Thrombozyten auf Glasplättchen beginnt, nach 15min vermehrt Filopodien ausgebildet werden und nach 45min die Zellausbreitung und Adhäsion von uninfizierten Thrombozyten zum Großteil abgeschlossen ist (siehe 3.1.1). Um den Effekt der Monosekretionsmutanten auf die Thrombozytenfläche und gleichzeitig den Einfluß der drei Versuchsansätze, also die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, untersuchen zu können, wird die multiple lineare Regression als multivariates Analyseverfahren eingesetzt. Für jeden Meßzeitpunkt (5min, 15min, 45min) wird ein separates Modell gerechnet. Bei den kategoriellen Einflussvariablen werden die Effekte in Relation zu einer Merkmalsausprägung, welche dann als Referenz fungiert, geschätzt. Bei der variablen Monosekretionsmutante fungiert die YopP-Monosekretionsmutante als Referenz, beim Versuchsansatz wird Versuch 1 als Referenz gewählt. Der gesamte Einfluss eines Merkmals wird mit Hilfe eines Globaltests bestimmt. Das Signifikanzniveau wird auf $\alpha=0,05$ festgesetzt. Durchgeführt wird die statistische Analyse mit dem Statistik-Softwarepaket SAS (Statistical Analysis System, Release 8.2). Es werden nur Versuche eingeschlossen, in denen zu allen untersuchten Zeitpunkten in drei an unterschiedlichen Tagen durchgeführten Versuchen verwertbare Daten existieren. Deswegen werden die Flächenmessungen und die morphologische Differenzierung der Monosekretionsmutanten, nicht aber die der Monodeletionsmutanten dargestellt.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgt mit Hilfe von Kit-Systemen der Firma Qiagen entsprechend der Anleitung. Das wesentliche Prinzip dieses Kits besteht in einem Aufschluß der Bakterien durch alkalische Lyse, gefolgt von einer Ausfällung der SDS-solubilisierten Proteine mit K-Azetat und Bindung der DNA an eine Anionenaustauschersäule. Nach dem Waschen wird die DNA von der Säule eluiert und durch Zugabe von Isopropanol gefällt.

2.2.4.2 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm. Die Absorption der DNA wird bei einer Verdünnung von 1:50 gegen den Leerwert von destilliertem Wasser gemessen. Für doppelsträngige DNA-Präparationen gilt das Verhältnis: $A_{260\text{nm}}: 1 = 50\mu\text{g DNA/ml}$. Verunreinigungen der Probe durch Proteine können durch zusätzliche Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von $\lambda=280\text{nm}$ identifiziert werden. Der Quotient $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ verringert sich mit zunehmender Verunreinigung der Probe mit Proteinen und beträgt bei sehr reiner DNA annähernd 1,8. Zur Verifizierung des Ergebnisses wird die Plasmid-DNA auf einem Gel aufgetrennt (siehe 2.2.4.4).

2.2.4.3 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung von DNA

Dieses Verfahren dient dazu, DNA von Proteinen und Salzen zu reinigen. Die wässrige Nukleinsäurelösung wird mit 1 Vol. einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25/24/1) versetzt, gemischt und zentrifugiert (5min, 13.000rpm, RT). Die DNA-haltige, wässrige Phase wird in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Um die abgenommene wässrige Phase von Phenolresten zu reinigen, wird diese mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) versetzt, gemischt und wieder zentrifugiert. Die obere Phase wird in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und die darin enthaltene DNA durch Zugabe von 0,3M Natriumacetat und 2 Vol. Ethanol p.a. (-20°C) 30min auf Eis gefällt. Bei geringen DNA-Mengen bzw. DNA-Fragmenten, wird der Ansatz für 1h auf Eis inkubiert. Anschließend wird nochmals zentrifugiert (10min, 13.000rpm, 0°C), das DNA-Pellet zweimal mit 500ml 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen destillierten Wassers gelöst.

2.2.4.4 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen kommen nur bei Bakterien vor und zeichnen sich durch ihre hohe Spaltungsspezifität aus. Sie spalten nur doppelsträngige DNA und diese nur an spezifischen Sequenzen, die aus wenigstens vier Basen bestehen und sich durch eine palindromische Struktur auszeichnen (Palindrom: Basensequenz ist bei beiden Einzelsträngen, jeweils vom 5'-Ende her gelesen, identisch). Der Restriktionsverdau wird bei den meisten Enzymen bei 37°C mit jeweils spezifischen Puffern durchgeführt. Pro mg Plasmid-DNA werden 2,5U Enzym eingesetzt und für 2h inkubiert. Das Endvolumen des Reaktionsansatzes wird so gewählt, dass die eingesetzte Enzymmenge 10% des Gesamtvolumens nicht überschreitet. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,1 Volumen eines 6x Ladepuffers gestoppt und auf ein DNA-Agarosegel geladen. Um die intramolekulare Ligation von DNA-Fragmenten zu verhindern, werden die 5'-Phosphatreste mit alkalischer Phosphatase entfernt. Die Dephosphorylierung erfolgt nach den Vorschriften des Herstellers. Pro pmol DNA werden 0,5U Enzym dem Restriktionsansatz zugesetzt und 1h bei 65°C inkubiert.

6x Auftragspuffer: 50% Glycerin, 1mM EDTA, 0,25% Bromphenolblau, pH 7,0

DNA-Agarose: 0,7% -1,5% Agarose in 1x TAE

10x TAE: 890mM Tris-Acetat, pH 7,5; 890mM Borsäure; 0,02M EDTA

2.2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Aufgrund ihrer negativen Ladung wandert DNA in einem elektrischen Feld vom Minus- zum Pluspol. DNA-Fragmentgemische können deshalb durch Elektrophorese in Agarosegelen aufgetrennt werden, was die Analyse ihrer Größe und die Abschätzung ihrer Konzentration anhand des aufgetragenen Längenstandards möglich macht. Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten einer Größe von 0,1 bis 10kb Länge werden Agarose-Flachbettgele mit einer Agarosekonzentration von 0,7 bis 1,4% eingesetzt. Hochprozentige Agarosegele trennen besser kleine; niederprozentige Gele besser größere Fragmente auf. Vor der Gelelektrophorese werden die Proben 1:5 oder 1:6 mit Auftragspuffer verdünnt. Die angelegte Spannung beträgt 90V (Feldstärke 5V/cm) und als Gel- und Laufpuffer dient 1x TAE. Anschließend wird das Gel für 10min in einem Ethidiumbromid-Bad (1mg/ml) gefärbt, mit anschließender UV-Beleuchtung die Banden sichtbar gemacht und ggf. die benötigte Bande ausgeschnitten.

6x Auftragspuffer: 50% Glycerin, 1mM EDTA, 0,25% Bromphenolblau, pH 7,0

10x TAE: 890mM Tris-Acetat, pH 7,5; 890mM Borsäure; 0,02M EDTA

2.2.4.6 Elution von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Die Elution von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel dient der Reinigung der Plasmid-DNA, um sie ggf. in ein Plasmid zu ligieren. Sie erfolgt gemäß der Gebrauchsanweisung des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen.

2.2.4.7 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente, die durch PCR oder Restriktionsverdau entstanden sind, lassen sich in bestimmte Plasmide, sogenannte Vektoren einbauen (=Ligation). Dann können die ligierten Vektoren in Bakterien transformiert und mit ihnen vermehrt werden (=Klonierung). DNA-Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer im gleichen Strang eines doppelsträngigen DNA-Moleküls gegenüberliegenden freien 3'-Hydroxyl-Gruppe. Die Ligation von DNA-Fragmenten wird mit T4-DNA-Ligase nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und 2 Stunden bei RT inkubiert. Um die Religationsrate des Vektors zu minimieren bzw. zu vermeiden wird das Fragment im Überschuss zum Ligationsansatz gegeben (Insert:Vektor = 3:1 bis 10:1), wobei 10 bis 50ng Vektor-DNA eingesetzt werden. Um die einzusetzenden Volumina von Vektor und Insert zu bestimmen, werden die Konzentrationen der Ligationspartner mittels Agarose-Gelelektrophorese neben einem DNA-Mengenstandard abgeschätzt. Im Anschluss an die Ligation wird der gesamte Ansatz in *E. coli*-Zellen DH5- α (SEM-cells) transformiert.

2.2.4.8 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen und Transformation

Die Erzeugung kompetenter *E. coli*-Zellen für die Aufnahme von Plasmid-DNA erfolgt nach dem Protokoll von Hiroaki, I. et al., (1990). Hierzu wird eine 250ml-Kultur in LB-Medium bei 18°C, 225rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen, dann werden die Zellen 10min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (10min, 4000rpm, 4°C) werden sie in 80ml TB-Puffer (0°C) resuspendiert, nochmals

10min auf Eis inkubiert und zentrifugiert. Nach erneuter Aufnahme in 20ml TB-Puffer und 7% DMSO werden die Zellen 10min auf Eis inkubiert, aliquotiert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Zellen können bei -196°C ohne Verlust der Transformationseffizienz mehrere Wochen gelagert werden. 200ml kompetente Zellen (DH5- α SEM-cells) werden wieder auf Eis aufgetaut, mit 10-500ng Plasmid-DNA vermischt und 30min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen 30sec auf 42°C hitzegeschockt, mit 800ml SOC-Medium versetzt und 1h bei 37°C regeneriert (150rpm). Die Zellen werden für 5sec pelletiert, resuspendiert und auf Selektionsplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37°C . Als Negativ- bzw. Positivkontrollen werden Transformationsansätze ohne bzw. mit ungeschnittenem Plasmid mitgeführt.

TB-Puffer: 10mM Pipes, 55mM MnCl_2 , 15mM CaCl_2 , 250mM KCl

SOC-Medium: 2% Select Pepton 140; 0,5% Select Yeast Extract, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgSO_4 , 10mM MgCl_2 , 20mM Glukose; pH7,0

2.2.4.9 Herstellung elektrokompenter *Yersinia*-Zellen und Transformation

Die Elektroporation stellt eine weitverbreitete Methode dar, um geschlossene zirkuläre DNA (Plasmide) in Empfängerbakterien zu transferieren. Das Prinzip ist, dass die DNA in einer Bakteriensuspension hoher Zelldichte kurzzeitig einem starken elektrischen Feld ausgesetzt wird. Dabei entstehen Poren in der Zellwand, so dass die Plasmid-DNA in das Zellinnere diffundieren kann. Dadurch, dass das Bakterium eine neue Antibiotika-Resistenz über das Plasmid erhält, vermehren sich nur die Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, wenn sie auf einem antibiotikahaltigen Agar ausgestrichen und inkubiert werden. Es wird eine 1:10 Verdünnung einer Übernachtskultur der *Yersinia* nur mit dem Sekretionsapparat und ohne den pACYC-Vektor mit LB-Medium gemacht und 2 bis 4h bei 27°C wachsen gelassen bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von etwa 0,3. Diese Bakterien werden zentrifugiert (2500g, 10min, 4°C), einmal in eiskaltem Wasser und zweimal in 10%-igen eiskalten Glycerol gewaschen mit dazwischen liegenden Zentrifugationsschritten. Nun werden sie in 300 μl 10%-iges Glycerol aufgenommen und bei -80°C eingefroren. Für die Transformation werden max. 5 μl des Ligationsansatzes (bzw. 1 μg Plasmid-DNA mit 50 μl kompetenten Bakterien vermischt) entsprechend der Betriebsanleitung des Elektroporationsgerätes bei 2,5kV, 25 μF und 200Ohm elektroporiert. Dieser Ansatz wird dann zu 800 μl LB-Medium gegeben, für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend auf Agarplatten mit Antibiotika ausgestrichen.

2.2.4.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur exponentiellen Amplifikation von DNA-Fragmenten dient die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), bei der DNA-Fragmente *in vitro* durch thermostabile DNA-Polymerasen vervielfältigt werden können (Saiki *et al.*, 1988).

Die Amplifikation erfolgt über zwei gegensätzlich orientierte Oligonukleotide. Diese hybridisieren mit den denaturierten Einzelsträngen der zu amplifizierenden DNA und dienen der DNA-Polymerase als Ansatzstelle zur Synthese.

Die PCR-Reaktion wird nach folgendem Protokoll durchgeführt :

1x	Reaktionspuffer + MgCl_2
je 25 mM	dNTP
je 5-10 pmol	Primer
5 bis 10ng	DNA
1U	Taq-Polymerase
Σ 50 μl	

Folgende Zyklen dienen der Amplifikation der DNA-Fragmente:

1x	Denaturierung	95°C	4 min.
25x	Denaturierung	95°C	60 sec.
	Hybridisierung	(T_H)	60 sec.
	Polymerisation	70°C	60 sec.
1x	Polymerisation	70°C	10 min.

Die Hybridisierungstemperatur (T_H) wird 4°C unterhalb der niedrigeren Schmelztemperatur der beiden Oligonukleotide gewählt (Suggs et al., 1981) und es werden 25 Amplifikationszyklen durchgeführt. Der Erfolg der PCR wird über Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

2.2.4.11 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen werden von der Firma GATC Biotech in Konstanz durchgeführt (www.gatc-biotech.com). Für die Auswertung der Sequenzierungs-Ergebnisse wird das Computerprogramm Windows 32 EditSeq 4.03 verwendet.

2.2.5 Proteinchemische Methoden

2.2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteingemischen werden SDS-Polyacrylamid-Gele eingesetzt. Das Detergenz SDS (Natrium-Dodecylsulfat) bindet an Proteine proportional ihrer molaren Masse (~ ein Molekül SDS pro zwei Aminosäurereste) und bewirkt die Dissoziation, Entfaltung und Solubilisierung komplexer Proteinmoleküle. Im elektrischen Feld wandern die von negativ geladenen SDS-Molekülen umgebenen Proteine Richtung Anode (Pluspol). Die Auftrennung der Proteine geschieht entsprechend ihrem Molekulargewicht, da kleinere Proteinmoleküle schneller wandern als größere. Die Methode bedient sich eines diskontinuierlichen Polyacrylamidgels, bestehend aus einem unteren 6-15%-igen Trenngel und einem oberen 5%-igen Sammelgel (Sambrook et al., 1989). Das Trenngel wird nach Zugabe von APS und TEMED in eine vertikale Gelkammer gefüllt. Um eine glatte Oberfläche des Polyacrylamids zu erhalten wird das Trenngel mit Wasser bedeckt, welches nach der Polymerisation abgegossen wird. Nun wird das Sammelgel luftblasenfrei darauf gegossen und der Taschenkamm eingesetzt. Das vollständig polymerisierte Gel wird in das Elektrophoresegerät eingelegt und durch Elektrophorese-Puffer mit Kathode und Anode verbunden. Die aufzutragenden Proben werden in SDS-Probenpuffer bei 100°C 5min denaturiert und anschließend in die Taschen des Acrylamidgels geladen.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt zunächst bei 50 - 80V (kleines Gel) bzw. 100V (großes Gel) und wird, nachdem die Farbstoffbande das Trenngel erreicht hatte, bei 100 - 120V (kleines Gel) bzw. 200V (großes Gel) weitergeführt. Danach werden die Proteine entweder für einen Immunoblot auf eine Membran transferiert oder als Gel direkt für 10 bis 15min mit Coomassie angefärbt. Anschließend an die Coomassiefärbung wird der Gelhintergrund mit Entfärbelösung (Destain) solange entfärbt, bis die aufgetrennten Proteinbanden gut sichtbar sind.

Coomassie-Färbelösung: 0,275% Coomassie Brilliant Blue R250 in 50% Methanol und 10% Essigsäure

Entfärbelösung Destain: 50% Methanol, 0,75% Essigsäure

Elektrophoresepuffer: 25mM Tris, 250mM Glycin, 0,1% SDS; pH 8,3

SDS-PAGE Trenngel 10% (klein): 7,9ml H₂O, 6,7ml 30% Protogel, 5ml 1,5M Tris-HCl pH 8,8; 200µl 10% SDS, 200µl 10% APS, 8µl TEMED

SDS-PAGE Sammelgel 5% (klein): 3,4ml H₂O, 830µl 30% Protogel, 630µl 1,0M Tris-HCl pH 6,8; 50µl 10% SDS, 50µl 10% APS, 5µl TEMED

SDS-PAGE Trenngel 7,5% (groß): 8,8ml 30% Protogel, 8,7ml 1,5M Tris-HCl, pH 8,8; 17ml H₂O, 350µl 10% SDS, 87,5µl 10% APS, 8,8µl TEMED

SDS-PAGE Sammelgel 4% (groß): 11ml H₂O, 1,9ml 1M Tris-HCl, pH 6,8; 150µl 10% SDS, 2ml 30% Protogel, 75µl 10% APS, 15µl TEMED

1x SDS-Probenpuffer: 3% SDS, 0,6M Tris/HCl pH 6,8; 10% Glycerin, 0,005% Bromphenolblau, 5% β-Mercaptoethanol

2.2.5.2 Proteintransfer auf Membranen

Beim Westernblot werden die Proteinbanden eines SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Membran übertragen (Rehm, H., 2000), wobei das Trennungsmuster der Proteine erhalten bleibt.

In einer Nassblot-Apparatur (kleines Gel) bzw. Halbtrocken-Apparatur (großes Gel) werden die Proteine des Polyacrylamidgels auf eine Nitrocellulose- (nasser Blot) oder PVDF-Membran (halbtrockener Blot) transferiert. Der Transfer erfolgt bei 400mA (kleines Gel) für 60min bzw. bei 200mA (großes Gel) für 90min. Der Proteinmarker wird mit Ponceau-Färbung angefärbt, die Markerbanden markiert und die Membran wieder mit Wasser entfärbt. Die Ponceau-Färbung ermöglicht die reversible Anfärbung von Proteinen einer Trägermembran (Sambrook et al., 1989) und dadurch auch eine Kontrolle des Proteintransfers. Sie ist empfindlicher als die Coomassiefärbung (untere Grenze etwa 50ng/Bande) und die Trichloressigsäure fixiert gleichzeitig die Proteine auf dem Blot (Rehm, 2000). Im Anschluss an den Transfer wird die Membran für mindestens 1h mit Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Proteinbindestellen auf der Membran abzusättigen.

Blockierlösung: 3% Bovines Serum-Albumin, 0,05% Tween 20 in 1x PBS

10x PBS: 8,10mM Na₂HPO₄, 1,47mM KH₂PO₄, 137mM NaCl, 2,68mM KCl; pH 7,4

1x Transferpuffer Nitrozellulosemembran: 12mM Tris; 96mM Glycin

Transferpuffer halbtrockener Blot PVDF-Membran:

Anode-Puffer 1: 0,3M Tris, 10% Methanol; pH 10,4

Anode-Puffer 2: 25mM Tris, 10% Methanol; pH 10,4

Kathode-Puffer: 25mM Tris, 40mM 6-Aminocapronsäure, 10% Methanol; pH 9,4

Ponceau-Färbelösung : 2% Ponceau in 3% Trichloressigsäure

2.2.5.3 Immunologische Detektion

Nach Inkubation des Westernblots mit spezifischen Antikörpern können Proteinbanden spezifisch nachgewiesen werden (Immunoblot). Der geblockte Blot wird 3x kurz und 3x 10 min gewaschen, dann etwa eine Stunde in einer feuchten Kammer bei RT mit dem 1. Antikörper in der angegebenen Verdünnung inkubiert. Danach wird ungebundener Antikörper durch 3x kurzes und 3x jeweils 10min dauerndes Waschen entfernt und die Membran mit einem Peroxidase-markierten Antikörper (2.Antikörper) 1h bei RT inkubiert. Dieser bindet an den Antikörper und hat eine Verdünnung von 1:10.000 in Waschpuffer. Nach weiterem Waschen wird die Membran mit Peroxidasesubstrat (ECL Reagents, Amersham) für 1min benetzt, in Frischhaltefolie gewickelt und auf einem Film exponiert. Peroxidase ist ein Enzym, das die Oxidation von Luminol katalysiert und damit eine Chemolumineszenz auslöst. Das entstandene Licht wird über einen Röntgenfilm gemessen, wobei die Expositionszeit zwischen 2 und 300s liegt.

Waschpuffer: 1x PBS, 0,1% Tween20

10x PBS: 8,10mM Na₂HPO₄, 18mM KH₂PO₄, 137mM NaCl, 2,68mM KCl; pH 7,4

2.2.5.4 Zytoskelettseparation

Eine Zytoskelettseparation führt durch Zentrifugation zur Trennung der Zelle in zytosolische Anteile und zytoskelettale Anteile, die so einzeln untersucht werden können. Die eingestellten Zellen werden bei 37°C in der angegebenen MOI mit Yersinien-Stämmen infiziert. Danach oder schon während der Infektion/Inkubation werden aktivierende oder hemmende Zusätze zugegeben. 700µl der Probe werden 100µl 8x Lysispuffer (nach Mukhopadhyay et al., 2001) zugesetzt, gemischt und 10min auf Eis lysiert. Die Probe wird bei 16.000g, 4°C, 20min zentrifugiert und 100µl des Überstandes (Zytosol) mit 100µl 2x Probenpuffer versetzt. Die Zentrifugenröhrchen werden dekantiert und das Pellet (Zytoskelett) in 50µl 1x Probenpuffer aufgenommen.

1x Lysispuffer: 1% Triton-X-100, 50mM Tris-HCl pH 7,4; 5mM EGTA, 5mM EDTA, 1mM sodium orthovanadate, 10µM Leupeptin, 1mM PMSF, 10µM Pepstatin A und 0,28U trypsin inhibitor/ ml Aprotinin, pH 7,5

2x Probenpuffer: 3,4% SDS, 1,5M Tris-HCl pH 6,8; 50% Glycerin, 0,1% Bromphenolblau, 10% β-Mercaptoethanol

1x Probenpuffer: 3% SDS, 0,6M Tris/HCl pH 6,8; 10% Glycerin, 0,005% Bromphenolblau, 5% β-Mercaptoethanol

2.2.5.5 Koimmunopräzipitation

Bei der Immunpräzipitation kann ein Antigen X über die spezifische Bindung an seinen immobilisierten X-Antikörper präzipitiert und analysiert werden. Als Trägermatrix für den Antikörper wird Protein A-Agarose verwendet. Werden neben dem spezifischen Antigen X noch seine Bindungspartner Y, Z usw. präzipitiert und analysiert, handelt es sich um eine Koimmunpräzipitationsanalyse. HeLa-Zellen werden mit den angegebenen Yersinien-Stämmen z.B. in einem Verhältnis von einer Zelle/30 Bakterien ($\text{MOI} = 1:30$) für 1 Stunde infiziert (siehe 2.2.2.3). Die Zellen werden zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen, von der Zellkulturflasche abgeschabt und zentrifugiert (400g, 5min, 4°C). Das Pellet wird vorsichtig mit kaltem PBS gewaschen, in 300µl eiskalten Lysispuffer aufgenommen und für 30min bei 4°C unter Bewegung inkubiert. Nach kurzem Zentrifugieren wird das Lysat klar und die Zellmembran- und Zellmembranbestandteile setzen sich ab. 50µl des Lysates werden mit 50µl 1x Probenpuffer vermischt (Lysatproben) und 250µl des Lysates auf 100µl vorbehandelte Protein A Agarose-beads (Boehringer Mannheim) gegeben. Die Vorbehandlung der Protein A Agarose-beads besteht in drei Mal mit PBS waschen, mit je 8µl Antikörper für 1h bei 4°C unter Bewegung inkubieren, drei Mal in Lysispuffer waschen und in 100µl Lysispuffer aufnehmen. Die 250µl Lysat mit den 100µl vorbehandelten Protein A Agarose-beads werden 1h bei 4°C unter Bewegung präzipitiert. Die Beads werden drei Mal in Lysispuffer gewaschen, in 50µl 1x Probenpuffer aufgenommen und 5min bei 100°C gekocht. Dann können die Proben auf einem SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und eine Immundetektion vorgenommen werden. Bei einer Koimmunpräzipitation aus Thrombozyten werden die Thrombozyten erst gewaschen (siehe 2.2.2.4) und mit Yersinien-Stämmen infiziert (siehe 2.2.2.5). Dann werden sie zentrifugiert (2500rpm, 10min, 4°C) und das Pellet wie oben beschrieben in 300µl eiskalten Lysispuffer aufgenommen und unter Bewegung inkubiert.

Lysispuffer: 20mM Tris-HCl, pH 7,5; 3mM MgCl_2 , 1mM EGTA, 0,1% Triton-X-100, 1mM PMSF, 2µg/ml Leupeptin, 2µg/ml Pepstatin

1x SDS-Probenpuffer: 3% SDS, 0,6M Tris-HCl pH 6,8; 10% Glycerin, 0,005% Bromphenolblau, 5% β -Mercaptoethanol

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der Interaktion zwischen Yersinien und Thrombozyten

In dieser Arbeit sollte die Interaktion zwischen Yersinien und Thrombozyten analysiert werden. Es gibt bereits sehr genaue Vorstellungen zur Funktion und Dynamik des Zytoskeletts von Thrombozyten. Auch die Interaktion mit Yersinien wurde untersucht: Yersinien werden von Thrombozyten internalisiert (Simonet et al., 1992). Da es nach Inkubation von Yersinien mit Thrombozyten zur Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten kommt (Simonet et al., 1992), sollte zunächst das Zytoskelett der Thrombozyten uninferiert und dann nach Inkubation mit unterschiedlichen *Yersinia*-Yop-Monodeletions- bzw. Monosekretionsmutanten morphologisch untersucht werden.

3.1.1 Adhäsionskinetik von Thrombozyten

Zunächst sollte untersucht werden, inwieweit Thrombozyten unter den gewählten Bedingungen auf Deckgläschen adhären können. Die Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts wurden über eine Zeitspanne von 3min bis 4h untersucht (hier gezeigt: 3min bis 45min). Dafür wurden auf mit Poly-L-Lysin benetzte Deckgläschen Thrombozyten zentrifugiert und nach den angegebenen Inkubationszeiten fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit einer Rhodamin/Phalloidin-Färbung dargestellt.

Rhodamin/Phalloidin färbt spezifisch das Aktin-Zytoskelett an. Angeregtes Rhodamin emittiert Licht

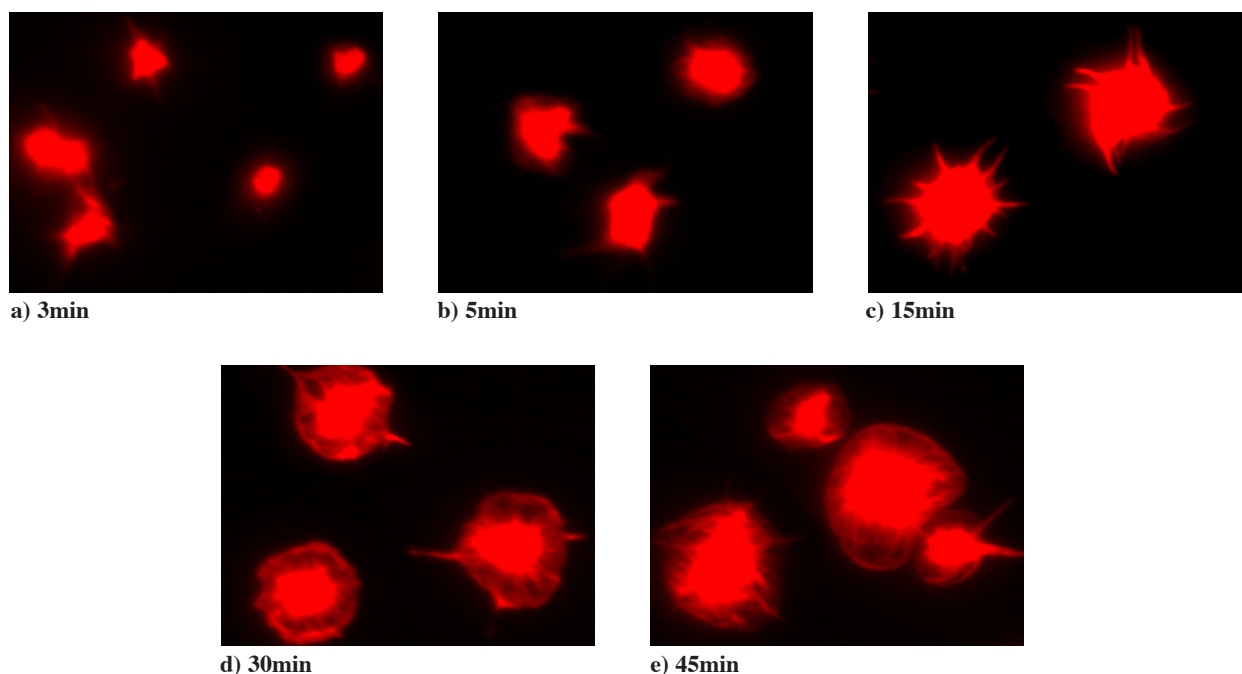


Abbildung 5: Zeitabhängige Adhärenz von Thrombozyten.

Auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen wurden Thrombozyten zentrifugiert (1500rpm, 5min, 28°C) und für die angegebenen Zeiten bei 37°C inkubiert. Nach dem Fixieren wurde das Aktin-Zytoskelett in einer Rhodamin/Phalloidin-Färbung (1:100 in PBS) dargestellt.

einer Wellenlänge von $\lambda=580\text{nm}$ und erscheint rot. Die zeitabhängige Adhärenz von Thrombozyten ist in Abb.5 dargestellt: nach 3min sind sie kaum adhären und haben noch die Form eines kleinen Balles, nach 5min sind erste feine Ausläufer in die Peripherie (= Filopodien) ausgebildet. Nach 15min haben sie mehr Filopodien, bis sie nach 30min sichtbare Lamellipodien ausgebildet haben, die zum Zeitpunkt 45min und 60min (nicht gezeigt) am stärksten ausgeprägt sind. Die Adhärenz von Thrombozyten ist somit nach 45min bis 60min abgeschlossen. Deswegen wurden die Zeitpunkte 5min, 15min und 45min gewählt für die Messung der Thrombozytenflächen und für die Differenzierung der Thrombozyten nach morphologischen Gesichtspunkten (siehe 3.1.5, 3.1.6).

3.1.2 Untersuchung des Einflusses des YopH-, YopE-, YopP- und YopO Effektorproteins auf das Zytoskelett von Thrombozyten

Die Wirkungen der unterschiedlichen Yops auf das Zytoskelett von Thrombozyten sollten vergleichend analysiert werden. Ausserdem sollte ein Yop gefunden werden, welches auf das Zytoskelett keine Auswirkungen hat. Dieses Yop könnte sich in folgenden Versuchen als Negativkontrolle eignen, um unspezifische Effekte der Yersinie von Yop-spezifischen Effekten abzugrenzen. Sollten während der Präparation und Zentrifugation der Thrombozyten Mediatoren freigesetzt werden, die einen Einfluss auf die Adhäsion und Zellausbreitung haben könnten, so sollten diese sowohl bei der Negativkontrolle als auch bei den anderen Proben sichtbar sein. Zur Analyse Yop-spezifischer Effekte wurden Monosekretionsmutanten verwendet. Alle Yop-Monosekretionsmutanten enthalten zwei Plasmide: Plasmid 1 (pTRANS) kodiert für den Typ-III-Mikroinjektionsapparat, Yad A und die Spektinomycin-Resistenz. Plasmid 2 ist ein pACYC 18 4-Vektor, der eine Chloramphenicol-Resistenz trägt und in den die jeweiligen Yops kloniert wurden (siehe Abb.6).

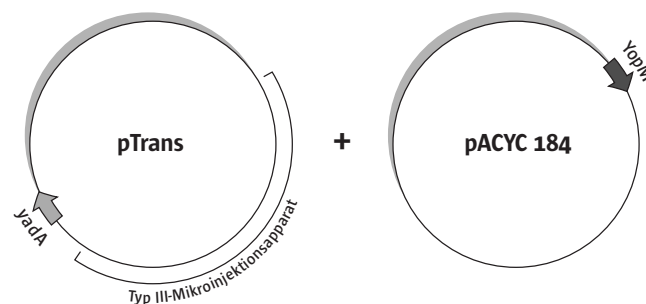
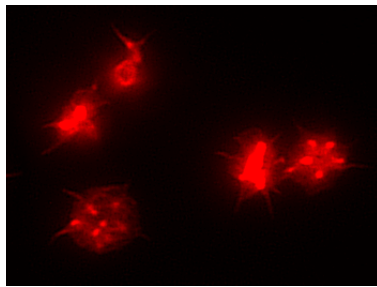


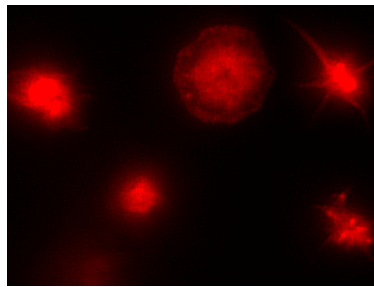
Abbildung 6:
Schematische Darstellung der verwendeten Monosekretionsmutante am Beispiel von Stamm WA-C(pTRANS,pCJYM).

Der Stamm WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) trägt neben dem Plasmid pTRANS das Plasmid pCJYE138-YP. E138-YP steht für die ersten 138 AS von YopE und das gesamte YopP. Die YopO-Monosekretionsmutante WA-C(pTRANS,pCJYE138-YO) enthält YopO und die ersten 138 Basen von YopE. WA-C(pTRANS,pCJYH) und WA-C(pTRANS,pCJYE) enthalten den YopH- bzw. YopE-Wt. Um möglichst viele Thrombozyten zu infizieren und an diesen das Zytoskelett zu untersuchen, wurde mit

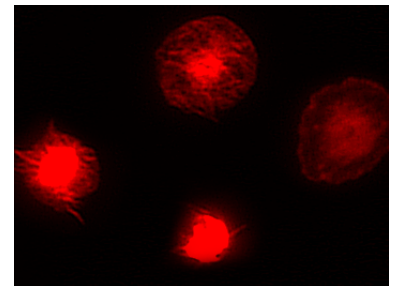
a) WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP)



5min

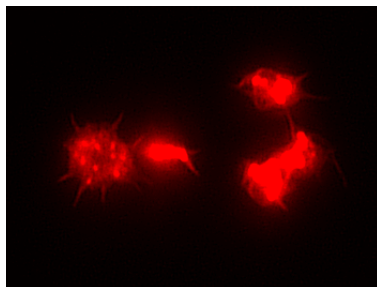


15min

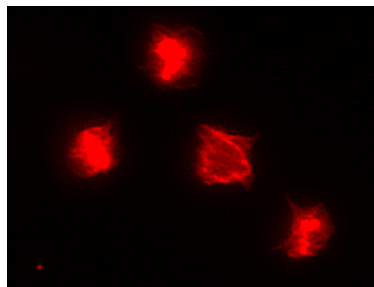


45min

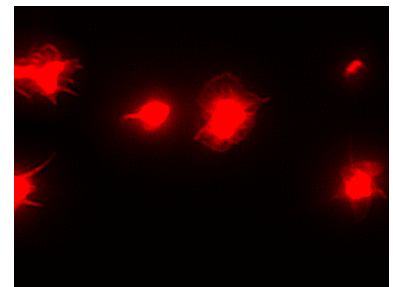
b) WA-C(pTRANS,pCJYH)



5min

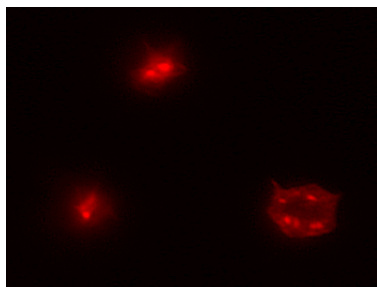


15min

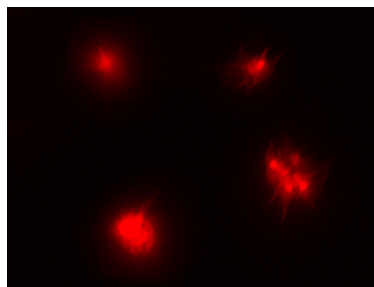


45min

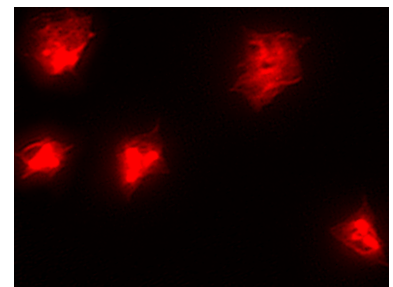
c) WA-C(pTRANS,pCJYE)



5min

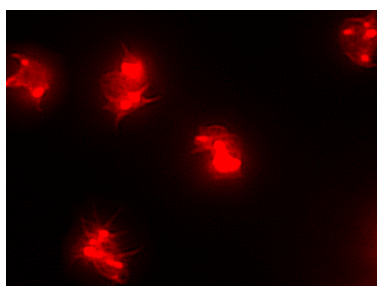


15min

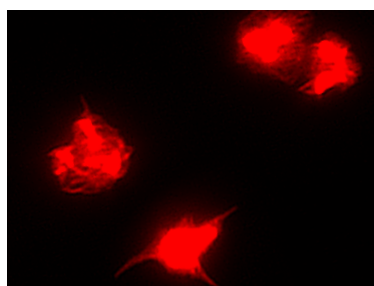


45min

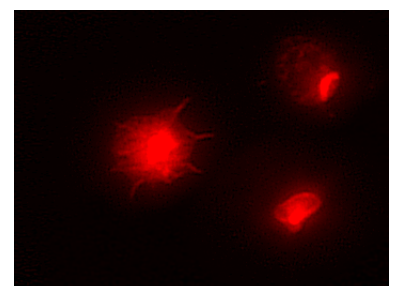
d) WA-C(pTRANS,pCJYE138-YO)



5min



15min



45min

Abbildung 7: Inkubation von Thrombozyten mit WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) führt zu keinen Zytoskelettveränderungen, Inkubation mit WA-C(pTRANS,pCJYH), WA-C(pTRANS,pCJYE) und WA-C(pTRANS,pCJYO) führt zu sichtbaren Zytoskelettveränderungen.

Thrombozyten wurden in einer MOI von 1:100 1h bei 37°C mit den jeweils angegebenen Yersinienstämmen inkubiert, auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen zentrifugiert (1500rpm, 5min, 28°C) und zu den angegebenen Zeiten fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde in einer Rhodamin/Phalloidin-Färbung dargestellt.

einer MOI von 1:100 infiziert. Thrombozyten wurden 60min mit WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP), WA-C(pTRANS,pCJYE138-YO), WA-C(pTRANS,pCJYE) bzw. WA-C(pTRANS,pCJYH) inkubiert, auf Deckgläschen zentrifugiert und zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit Rhodamin/Phalloidin dargestellt.

YopP induziert in Makrophagen Apoptose (Monack et al., 1998), ein Einfluss auf die Zytoskelettorganisation konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Wie in Abb.7a gezeigt, können mit WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) inkubierte Thrombozyten sehr gut adhären und sich ausbreiten, eine Störung des Zytoskeletts kann hier nicht beobachtet werden. Nach 15min sind Filopodien ausgebildet und nach 45min Lamellipodien. Das Zytoskelett dieser Zellen zeigt eine reproduzierbare Ähnlichkeit zu uninfizierten Zellen (siehe Abb.5), deswegen eignet sich WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) gut als Kontrollstamm. YopH besitzt in vitro Tyrosinphosphatase-Aktivität, zerstört fokale Adhäsionskomplexe (Hamid et al., 1999) und beeinflusst die Zytoskelettausbildung. Wie in Abb.7b gezeigt, besitzen die mit WA-C(pTRANS,pCJYH) inkubierten Thrombozyten eine kleinere Zellfläche als mit der YopP-Monosekretionsmutante inkubierte Thrombozyten und kleinere Lamellipodien. HeLa-Zellen, in die YopE injiziert wurden, verändern ihr Aktin-Zytoskelett: sie runden sich ab und verlieren ihre Anheftung an das Substrat (Rosquist et al, 1991). Die Zellfläche der mit WA-C(pTRANS,pCJYE) inkubierten Thrombozyten (Abb.7c) ist kleiner und die Lamellipodienstruktur erscheint ungeordneter. Hakansson beschreibt Abrundungen von mit einer YopO-Monosekretionsmutante infizierten HeLa-Zellen, die aber nicht zu einer Ablösung von der extrazellulären Matrix führt (Hakansson et al., 1996). Wie in Abb.7d dargestellt, haben die mit WA-C(pTRANS,pCJYE138-YO) inkubierten Thrombozyten eine kleinere Zellfläche und nach 45min wenige Lamellipodien. Allgemein ist zu beobachten, dass vor allem die mit WA-C(pTRANS,pCJYE) bzw. WA-C(pTRANS,pCJYH) inkubierten Thrombozyten schlecht adhären können. Diese verschlechterte Adhärenz und der Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett ist zeitabhängig nicht durch die betroffenen Zellen korrigierbar.

3.1.3 Charakterisierung von YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM)

Vor der Analyse der Interaktion von YopM mit Thrombozyten sollte die YopM-Monosekretionsmutante (WA-C(pTRANS,pCJYM)) genau charakterisiert werden. WA-C(pTRANS,pCJYM) wurde von Dr. Trülsch am Max von Pettenkofer-Institut München hergestellt, sie mikroinjiziert YopM. Wie in 1.3.7 dargestellt, kann YopM durch die unterschiedliche Anzahl von Leuzin-reichen Wiederholungssequenzen variable Größen haben. Da die Sequenz von YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM) bei Beginn der Arbeiten nicht bekannt war, wurde das Gen zunächst sequenziert. Bei der Sequenzierung wurden die Primer Seq1 für die Bindung an den pACYC-Vektor N-terminal und Seq2 für die Bindung an den pACYC-Vektor C-terminal eingesetzt. Um eine Überlappung der Basen im Mittelteil zu erhalten erfolgte eine dritte Sequenzierung mit dem Primer YopMMitte.

Abbildung 8 zeigt die Basensequenz von YopM aus dem Stamm WA-C(pTRANS,pCJYM). YopM hat die Größe von 1581 Basen (Start bis Stop) und zeigt beim Sequenzvergleich große Übereinstimmung zu YopM aus dem Stamm *Yersinia enterocolitica* AY150843 (Foultier et al., gi: 28302111), lediglich eine Base ist unterschiedlich. Statt einem C (in Abb.8 rot markiert) an Position 388 in der Sequenz von

```

1   atgtatggtt ttgtttgcaa tgaaaaaccc gataataaaa atattttcag aagggcattc aatatgttta
71  taaatccaag aaatgtatct aatacttttt tgcaagaacc attacgtcat tcttctgatt taactgagat
141 accggttgag gcagaaaatg ttaaacttaa gactgaatat tataatgcat ggtcggaatg ggaacgaaat
211 gccctccgg ggaatggtga acagagggaa atggcggttt caagggtacg cgattgtctg gaccgacaag
281 cccatgagct agaactaaat aatctggggc tgagtctttt gccggaatta cctccgcatt tagagaggtt
351 agtggcgtca tgaattctc ttacagaatt accggaactg ccgcagagcc tgaaatcact tgaagtttat
421 gagaataatc tgaaggcatt acccgattta cctcctttac tggtagatct tagagtcttt aataatcagc
491 tggaggaatt gccagagttg caaaacttgc cttcttgac tgagatttat gcgaataaca attcactgaa
561 aacattaccc gatttacccc cttactggt agatcttaat gtcagagaaa attattaac tgctctgcca
631 gaattaccgc agagtttaat cttcttagat atttctgata atattctttc tggattatcg gaattgccac
701 caaactgtc ttgtctcgat gcatcccgca atggaataag atccttatgc gatttacccc cttactggt
771 atatcttgat gtcagagata atcagttgat cgaactgcc aacgttacct caggcttaga acgtttaatc
841 gcttcattta atcatcttgc tgaattacct gaattgccac caaacttgta ttatcttgat gcatcccgca
911 atgaaataag ctcttatgc gatttacccc cttactggt agatcttaat gtcagaaaga atcagttgat
981 cgaactgcc aacgttacct cagacttaga acgtttaatc gcttcattta atcatcttgc tgaattacct
1051 gaattgccac caaactgtc ttatctcgat gcatcccgca atgaaataag ctcttatgc gatttacccc
1121 cttactggt agatcttaat gtcagaaaga atcagttgat cgaactgcc aacgttacct cagacttaga
1191 acgtttaatc gcttcattta atcatcttgc tgaattacct gaattgccac caaactgtc ttatctcgat
1261 gcatcccgca atgaaataag ctcttatgc gatttacccc cttactggt agaacttgat gtcagagata
1331 atcagttgat cgaactgcc aacgttacct cagacttaga acgtttaatc gcttcattta atcatcttgc
1401 tgaagtacct gaattgccgc aaaacctgaa acagctccac gtagagcaca acgctctaag agagtttccc
1471 gatatactg agtcagtgga agatcttcgg atggactctg aacgtgtaat tgatccatat gaatttgctc
1541 atgagactat agacaaactt gaagatgatg ttttgagta g

```

Abbildung 8: Sequenz von YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM).

YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM) zeigt hohe Sequenzhomologie zu YopM aus *Y. enterocolitica* AY150843 (gi:28302111). Die einzige Differenz auf Nukleotidebene an Position 388 führt zu keinem Aminosäureaustausch.

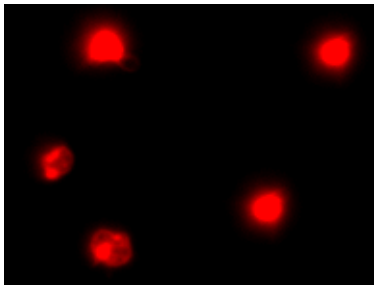
YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM) hat YopM aus dem Stamm *Yersinia enterocolitica* AY150843 (gi:28302111) an dieser Position ein T. Diese Differenz führt zu unterschiedlichen Basentriplets: CTG statt TTG. Da beide Codons für die hydrophobe Aminosäure Leuzin codieren, hat die Abweichung der einen Base mit großer Wahrscheinlichkeit keine weiterführende Konsequenz.

3.1.4 Untersuchung des Einflusses des YopM-Effektorproteins auf das Zytoskelett von Thrombozyten

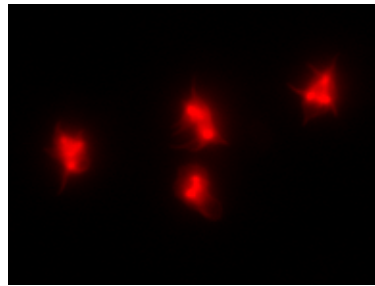
Um den Effekt von YopM auf das Aktin-Zytoskelett von Thrombozyten zu untersuchen, wurden Thrombozyten 60min in einer MOI von 1:100 mit WA-C(pTRANS,pCJYM) bzw.

WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) in Suspension inkubiert, auf Deckgläschen zentrifugiert und zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit Rhodamin/Phalloidin dargestellt. Mit WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) inkubierte Zellen zeigen eine gute Adhäsion. Dagegen ist bei mit WA-C(pTRANS,pCJYM) inkubierten Thrombozyten eine stark gestörte Adhärenz sichtbar. Zum Zeitpunkt 5min sind die Zellen abgerundet und kleiner als mit WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) inkubierte Zellen. Nach 15min haben mit WA-C(pTRANS,pCJYM) inkubierte Zellen eine

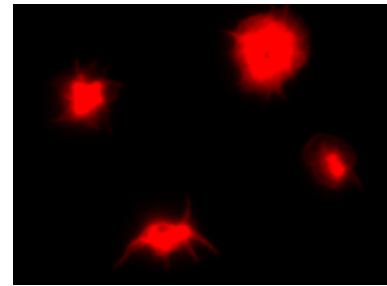
a) WA-C(pTRANS,pCJYM)



5min

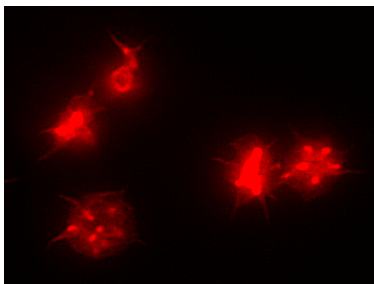


15min

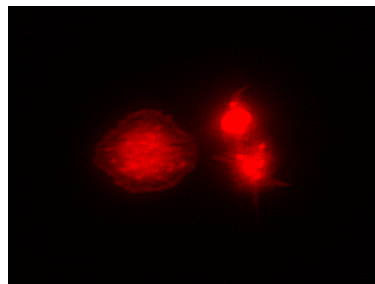


45min

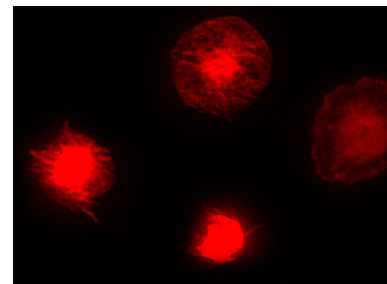
b) WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP)



5min



15min



45min

Abbildung 9: Mit WA-C(pTRANS,pCJYM) inkubierte Thrombozyten zeigen eine gestörte Adhärenz auf Deckgläschen. Thrombozyten wurden in einer MOI von 1:100 1h bei 37°C mit WA-C(pTRANS,pCJYM) (a) bzw. WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) (b) inkubiert, auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen zentrifugiert (1500rpm, 5min, 28°C) und zu den angegebenen Zeiten fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde in einer Rhodamin/Phalloidin-Färbung dargestellt.

kleinere Zellfläche, es sind feine Filopodien sichtbar. Mit WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) inkubierte Zellen zeigen zu diesem Zeitpunkt Filopodien und erste Lamellipodien. Nach 45min Inkubation von Thrombozyten mit WA-C(pTRANS,pCJYM) ist die Zellfläche immer noch kleiner, es sind feine Filopodien und kleinere Lamellipodien sichtbar. Mit WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) inkubierte Zellen zeigen zu diesem Zeitpunkt eine Dominanz der Morphologie Lamellipodien und eine komplette Ausbreitung und Adhärenz der Zelle.

Allgemein ist sichtbar, dass mit WA-C(pTRANS,pCJYM) inkubierte Zellen über die gesamte Zeitspanne von 5min bis 45min eine gestörte Adhäsion aufweisen. Durch die verzögerte Adhäsion kommt es bei mit WA-C(pTRANS,pCJYM) inkubierten Zellen erst nach einer Adhärenzzeit von 45-90min zur Ausbildung von Lamellipodien, die Zellen haben immer noch eine etwas kleinere Größe als die Negativkontrolle (nicht gezeigt).

Um diese Ergebnisse quantitativ darstellen zu können, wurden die Thrombozyten nach morphologischen Gesichtspunkten differenziert und die Thrombozytenflächen ausgemessen (siehe 3.1.5, 3.1.6).

3.1.5 Morphologische Untersuchung der mit Yop-Monosekretionsmutanten inkubierten Thrombozyten

Die Veränderungen des Zytoskeletts adhätierender Thrombozyten können durch fluoreszenzmikroskopische Bilder gezeigt werden (siehe 3.1.2 und 3.1.4). Um diese Ergebnisse zu quantifizieren, wurden die Thrombozyten nach morphologischen Gesichtspunkten differenziert. Für die Differenzierung der Thrombozytenmorphologie wurden die Parameter Abrundung, Filopodien und Lamellipodien gewählt, da diese bei der Ausbreitung von Thrombozyten von Croce et al. (Croce et al., 1999) beschrieben werden. Filopodien sind in dieser Auswertung analog zu Potter et al. (Potter et al., 1998) definiert als periphere Aktinmikroausläufer. Lamellipodien sind analog zu Potter et al. definiert als konvexe aktinhaltige Strukturen an der Zellgrenze, die auf eine Ausbreitung der Zelle hinweisen. Der Begriff Abrundung steht, angelehnt an Croce et al. (Croce et al., 1999), für unausgebreitete Thrombozyten, die weder Filopodien noch Lamellipoden vorweisen.

Es werden je 100 sich nicht berührende adhätierte uninfierte bzw. mit Yop-Monosekretionsmutanten inkubierte Thrombozyten (siehe 3.1.1, 3.1.2 und 3.1.4) von drei an verschiedenen Tagen durchgeführten Versuchen morphologisch differenziert (siehe 2.2.3.2). Die relativen Häufigkeiten werden zeitabhängig für die Versuche 1-3 tabellarisch (Tab. 14) und graphisch (Abb.10) dargestellt.

Sichtbar ist, dass mit YopP aus WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) inkubierte und uninfierte Thrombozyten einen ähnlichen zeitlichen Verlauf morphologischer Veränderungen zeigen. Nach 5min besitzen sie viele Abrundungen, zum Zeitpunkt 15min sind viele Filopodien und Lamellipodien vorhanden und zum Zeitpunkt 45min stehen Lamellipodien deutlich im Vordergrund. Deswegen können mit YopP aus WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) inkubierte Thrombozyten gut als Negativkontrolle verwendet werden. Bei mit der YopH, YopM, YopE und YopO-Monosekretionsmutante inkubierten Thrombozyten sind sehr viel mehr abgerundete Thrombozyten vorhanden. Deren Dominanz bleibt trotz leichter Schwankungen im zeitlichen Verlauf bestehen. Die drei zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführten Untersuchungen zeigen leichte Schwankungen und z.T. Änderungen in der Häufigkeitsreihenfolge von Abrundungen, Filopodien und Lamellipodien. Dennoch bleibt bei mit YopP aus WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) inkubierten und uninfizierten Thrombozyten der morphologische zeitliche Verlauf deutlich bestehen. Auch bei mit der YopH, YopM, YopE und YopO-Monosekretionsmutante inkubierten Thrombozyten ist weiterhin in allen drei Versuchen eine klare Dominanz der Abrundungen sichtbar.

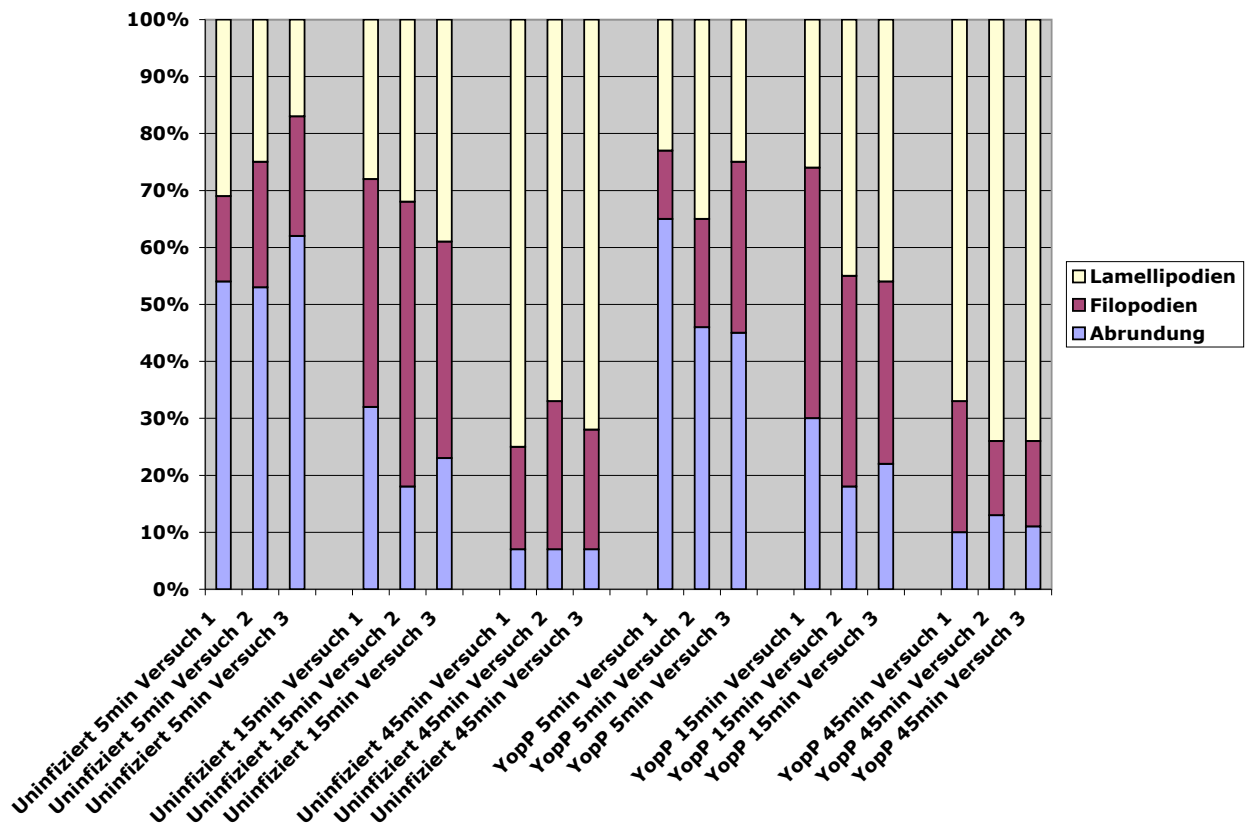
Der simultane Einfluß der Monosekretionsmutanten und des Versuchsansatzes auf die Morphologie von Thrombozyten werden mit Hilfe des Baseline-Category Logit Models untersucht (Tab. 15).

Als Referenz der Zielgröße Morphologie dient die Ausprägung Abrundung, bei den Einflussgrößen dienen YopP und Versuch 1 als Referenz. Das Signifikanzniveau wird auf $\alpha=0,05$ festgelegt. Zu den Zeitpunkten 5min und 15min ergibt das Baseline-Category Logit Model einen signifikanten Einfluß der Monosekretionsmutanten und des Versuchsansatzes auf die Morphologie der Zelle. Zum Zeitpunkt 45min ergibt es einen signifikanten Einfluß für die Monosekretionsmutanten, nicht aber für den Versuchsansatz.

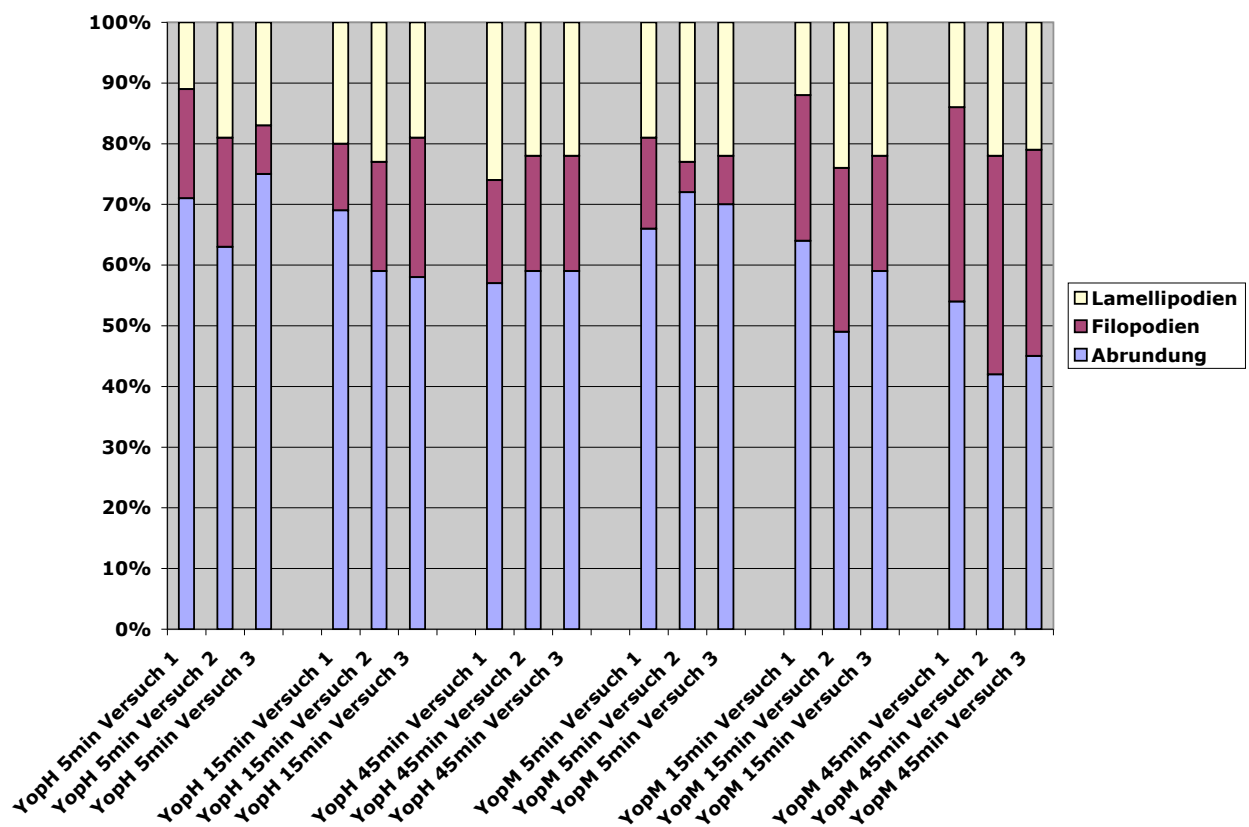
Yop, Zeitpunkt, Versuch	Abrundung (n=100) (%)	Filopodien (n=100) (%)	Lamellipodien (n=100) (%)
Uninfiziert, 5min, Versuch 1	54	15	31
Uninfiziert, 5min, Versuch 2	53	22	25
Uninfiziert, 5min, Versuch 3	62	21	17
Uninfiziert, 15min, Versuch 1	32	40	28
Uninfiziert, 15min, Versuch 2	18	50	32
Uninfiziert, 15min, Versuch 3	23	38	39
Uninfiziert, 45min, Versuch 1	7	18	75
Uninfiziert, 45min, Versuch 2	7	26	67
Uninfiziert, 45min, Versuch 3	7	21	72
YopP, 5min, Versuch 1	65	12	23
YopP, 5min, Versuch 2	46	19	35
YopP, 5min, Versuch 3	45	30	25
YopP, 15min, Versuch 1	30	44	26
YopP, 15min, Versuch 2	18	37	45
YopP, 15min, Versuch 3	22	32	46
YopP, 45min, Versuch 1	10	23	67
YopP, 45min, Versuch 2	13	13	74
YopP, 45min, Versuch 3	11	15	74
YopH, 5min, Versuch 1	71	18	11
YopH, 5min, Versuch 2	63	18	19
YopH, 5min, Versuch 3	75	8	17
YopH, 15min, Versuch 1	69	11	20
YopH, 15min, Versuch 2	59	18	23
YopH, 15min, Versuch 3	58	23	19
YopH, 45min, Versuch 1	57	17	26
YopH, 45min, Versuch 2	59	19	22
YopH, 45min, Versuch 3	59	19	22
YopM, 5min, Versuch 1	66	15	19
YopM, 5min, Versuch 2	72	5	23
YopM, 5min, Versuch 3	70	8	22
YopM, 15min, Versuch 1	64	24	12
YopM, 15min, Versuch 2	49	27	24
YopM, 15min, Versuch 3	59	19	22
YopM, 45min, Versuch 1	54	32	14
YopM, 45min, Versuch 2	42	36	22
YopM, 45min, Versuch 3	45	34	21
YopE, 5min, Versuch 1	67	11	22
YopE, 5min, Versuch 2	54	11	35
YopE, 5min, Versuch 3	65	19	16
YopE, 15min, Versuch 1	54	26	20
YopE, 15min, Versuch 2	61	16	23
YopE, 15min, Versuch 3	54	28	18
YopE, 45min, Versuch 1	79	9	12
YopE, 45min, Versuch 2	70	11	19
YopE, 45min, Versuch 3	81	9	10
YopO, 5min, Versuch 1	67	23	10
YopO, 5min, Versuch 2	57	24	19
YopO, 5min, Versuch 3	76	13	11
YopO, 15min, Versuch 1	75	21	4
YopO, 15min, Versuch 2	51	34	15
YopO, 15min, Versuch 3	48	50	2
YopO, 45min, Versuch 1	66	6	28
YopO, 45min, Versuch 2	59	17	24
YopO, 45min, Versuch 3	70	15	15

Tabelle 14: Uninfizierte und mit der YopP-Monosekretionsmutante inkubierte Thrombozyten zeigen ähnliche Häufigkeiten der Morphologien Abrundung, Filopodien, Lamellipodien. Mit der YopH, YopM, YopE und YopO-Monosekretionsmutante inkubierte Thrombozyten zeigen eine Dominanz von Abrundungen.

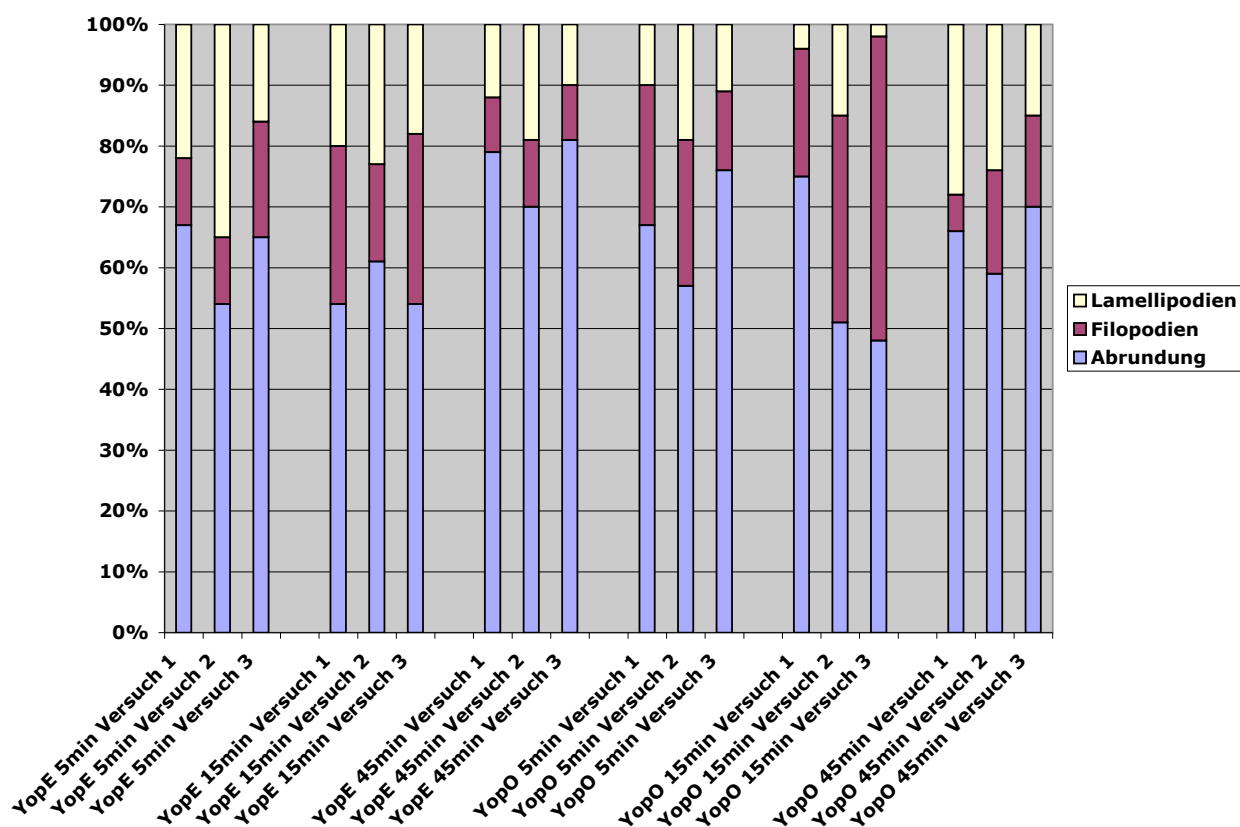
Thrombozyten wurden mit den jeweils angegebenen Yersinienstämmen inkubiert (MOI 1:100, 1h, 37°C), auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen zentrifugiert (1500rpm, 5min, 28°C) und zu den angegebenen Zeiten fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit einer Rhodamin/Phalloidin-Färbung dargestellt und die Präparate mit dem Mikroskop Olympus BX 61 mikroskopiert. Von drei Versuchen wurden je 100 sich nicht berührende Thrombozyten nach morphologischen Gesichtspunkten differenziert.



a) Uninfizierte und mit der YopP-Monosekretionsmutante inkubierte Thrombozyten zeigen ähnliche Häufigkeiten der Morphologien Abrundung, Filopodien, Lamellipodien.



b) Mit der YopH- und YopM-Monosekretionsmutante inkubierte Thrombozyten zeigen eine Dominanz von Abrundungen.



c) Mit der YopE- und YopO-Monosekretionsmutante inkubierte Thrombozyten zeigen, wie die mit der YopH- und YopM-Monosekretionsmutante inkubierten Thrombozyten, eine Dominanz von Abrundungen.

Abbildung 10: Uninfizierte und mit der YopP-Monosekretionsmutante inkubierte Thrombozyten zeigen eine ähnliche Morphologie mit im Zeitverlauf abnehmenden abgerundeten Zellen. Mit der YopH, YopM, YopE und YopO-Monosekretionsmutante inkubierte Thrombozyten besitzen deutlich mehr abgerundete Zellen.

Thrombozyten wurden mit den jeweils angegebenen Yersinienstämmen inkubiert (MOI 1:100, 1h, 37°C), auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen zentrifugiert (1500rpm, 5min, 28°C) und zu den angegebenen Zeiten fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit einer Rhodamin/Phalloidin-Färbung dargestellt und die Präparate mit dem Mikroskop Olympus BX 61 mikroskopiert. Von drei Versuchen wurden je 100 sich nicht berührende Thrombozyten nach morphologischen Gesichtspunkten differenziert.

Variable	Vergleich	OR	p
Uninfiziert	1	0,81	0,2833
Uninfiziert	2	0,877	0,5412
YopH	1	0,42	< 0,0001
YopH	2	0,537	0,0056
YopM	1	0,575	0,0053
YopM	2	0,344	< 0,0001
YopE	1	0,736	0,1147
YopE	2	0,563	0,0123
YopO	1	0,373	< 0,0001
YopO	2	0,765	0,2052
Versuch 2	1	1,532	0,0031
Versuch 2	2	1,196	0,2725
Versuch 3	1	0,923	0,5999
Versuch 3	2	1,045	0,7842

Ergebnis:

Yop	< 0,0001
Versuchsansatz	0,0056

a) Nach 5min zeigen sowohl die Yop-Monosekretionsmutanten als auch der Versuchsansatz einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Thrombozytenmorphologie.

Variable	Vergleich	OR	p
Uninfiziert	1	0,809	0,33
Uninfiziert	2	1,084	0,7019
YopH	1	0,194	< 0,0001
YopH	2	0,17	< 0,0001
YopM	1	0,197	< 0,0001
YopM	2	0,248	< 0,0001
YopE	1	0,211	< 0,0001
YopE	2	0,253	< 0,0001
YopO	1	0,07	< 0,0001
YopO	2	0,367	< 0,0001
Versuch 2	1	2,004	< 0,0001
Versuch 2	2	1,464	0,0072
Versuch 3	1	1,731	0,0005
Versuch 3	2	1,473	0,0059

Ergebnis:

Yop	< 0,0001
Versuchsansatz	< 0,0001

b) Nach 15min zeigen sowohl die Yop-Monosekretionsmutanten als auch der Versuchsansatz einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Thrombozytenmorphologie.

Variable	Vergleich	OR	p
Uninfiziert	1	1,612	0,1043
Uninfiziert	2	2,065	0,0304
YopH	1	0,063	< 0,0001
YopH	2	0,209	< 0,0001
YopM	1	0,064	< 0,0001
YopM	2	0,481	0,0044
YopE	1	0,028	< 0,0001
YopE	2	0,083	< 0,0001
YopO	1	0,054	< 0,0001
YopO	2	0,129	< 0,0001
Versuch 2	1	1,187	0,2688
Versuch 2	2	1,318	0,1016
Versuch 3	1	0,95	0,7434
Versuch 3	2	1,071	0,6843

Ergebnis:

Yop	< 0,0001
Versuchsansatz	0,4241

c) Nach 45min zeigen die Yop-Monosekretionsmutanten einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Thrombozytenmorphologie. Der Versuchsansatz hat nach 45min keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Morphologie der Thrombozyten.

Tabelle 15: Zu den Zeitpunkten 5min, 15min zeigen sowohl die Monosekretionsmutanten als auch die Versuchswiederholung einen signifikanten Einfluss auf die Morphologie der Thrombozyten. Nach 45min zeigen nur die Monosekretionsmutanten, nicht aber die Versuchswiederholungen einen signifikanten Einfluss auf die Thrombozytenmorphologie.

Darstellung der statistischen Berechnung der morphologischen Differenzierung von Thrombozyten für 5min, 15min, 45min (a-c) mittels Baseline-Category Logit Model und Darstellung der Wahrscheinlichkeit (OR=Odds ratio) des Auftretens von Filopodien (Vergleich 1) bzw. Lamellipodien (Vergleich 2) zur Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Abrundung. Als Referenz dienen YopP und Versuch 1. Das Signifikanzniveau wird auf $\alpha=0,05$ festgelegt.

3.1.6 Flächenmessung der mit Yop-Monosekretionsmutanten inkubierten Thrombozyten

Die Veränderungen des Zytoskeletts adhätierender Thrombozyten können durch fluoreszenz-mikroskopische Bilder gezeigt werden (siehe 3.1.2 und 3.1.4). In 3.1.5. konnte gezeigt werden, dass mit der YopP-Monosekretionsmutante inkubierte und uninfierte Thrombozyten eine ähnliche Morphologie aufweisen mit im Zeitverlauf zunehmenden Lamellipodien und abnehmenden Abrundungen. Die mit der YopH, YopM, YopE, YopO-Monosekretionsmutante inkubierten Thrombozyten zeigen im zeitlichen Verlauf vorwiegend Abrundungen. Unter physiologischen Bedingungen kommt es bei Kontakt von Thrombozyten mit subendothelialer Matrix zu Morphologieveränderungen und zu einer Expansion der Gesamtoberfläche (Hartwig et al., 1999; Gawaz, 2001). Um eine quantitative Aussage über mögliche Änderungen der Thrombozytenoberfläche treffen zu können, wird die Fläche von je 100 sich nicht berührenden adhätierten uninfierten bzw. mit Yop-Monosekretionsmutanten inkubierten Thrombozyten (siehe 3.1.1, 3.1.2 und 3.1.4) von drei an verschiedenen Tagen durchgeführten Versuchen gemessen (siehe 2.2.3.2). Neben der tabellarischen Darstellung der Mittelwerte der Flächenmessungen (Tab.16) werden diese graphisch dargestellt (Abb.11).

Beim Vergleich der Flächenmittelwerte (Tab.16, Abb.11) fällt auf, dass mit der YopP-

Yop, Zeitpunkt	Versuch 1 (n=100) (MW in μm)	Versuch 2 (n=100) (MW in μm)	Versuch 3 (n=100) (MW in μm)
Uninfiziert, 5min	11,20	13,00	13,34
Uninfiziert, 15min	15,75	23,36	19,95
Uninfiziert, 45min	22,50	24,80	27,67
YopP, 5min	17,19	15,77	18,41
YopP, 15min	21,05	26,05	22,99
YopP, 45min	20,54	26,59	20,34
YopH, 5min	7,17	9,82	6,38
YopH, 15min	9,73	9,15	6,24
YopH, 45min	11,15	12,67	10,37
YopM, 5min	9,57	12,56	10,45
YopM, 15min	10,95	10,96	8,21
YopM, 45min	11,65	13,44	15,27
YopE, 5min	7,65	10,66	5,18
YopE, 15min	7,06	7,31	6,44
YopE 45min	9,95	11,08	9,24
YopO, 5min	12,10	14,75	10,41
YopO, 15min	11,13	14,77	11,32
YopO, 45min	9,10	13,23	9,60

Tabelle 16: Uninfizierte und mit der YopP-Monosekretionsmutante inkubierte Thrombozyten zeigen eine im Zeitverlauf zunehmende Zellfläche. Die Zellfläche von mit der YopH, YopM, YopE, YopO-Monosekretionsmutante inkubierten Thrombozyten ist kleiner und bleibt im Zeitverlauf relativ stabil.

Thrombozyten wurden mit den jeweils angegebenen Versinienstämmen inkubiert (MOI 1:100, 1h, 37°C), auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen zentrifugiert (1500rpm, 5min, 28°C) und zu den angegebenen Zeiten fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit einer Rhodamin/Phalloidin-Färbung dargestellt und die Präparate mit dem Mikroskop Olympus BX 61 photographiert. Von drei Versuchen werden die Zellkonturen von je 100 sich nicht berührenden Zellen markiert und mit der Software cell[^] die Flächengröße ermittelt. Darstellung der Mittelwerte (MW) der Thrombozytenflächen in μm im Zeitverlauf.

Monosekretionsmutante inkubierte Thrombozyten ähnliche Flächengrößen wie uninfinzierte Thrombozyten besitzen. Die Flächengrößen nehmen im zeitlichen Verlauf zu. Deswegen können mit YopP aus WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) inkubierte Thrombozyten gut als Negativkontrolle verwendet werden. Im Unterschied dazu stehen mit der YopH, YopM, YopE und YopO-Monosekretionsmutante inkubierte Thrombozyten, die kleine, im Zeitverlauf relativ stabil bleibende Flächen besitzen. Die drei zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführten Versuche zeigen kleinere Variationen in den Flächengrößen. Die Abweichungen könnten darauf zurückzuführen sein, dass es sich um primäre Zellpräparationen handelt, das heisst, die Thrombozyten jedes Versuches stammen von einem anderen Menschen. Beim Vergleich der Versuche bleibt dennoch der oben beschriebene Größenunterschied gut sichtbar zwischen mit YopP aus WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) inkubierten bzw. uninfinzierten Thrombozyten und Thrombozyten, die mit der YopH, YopM, YopE bzw. YopO-Monosekretionsmutante inkubiert wurden. Die Ergebnisse der morphologischen Differenzierung spiegeln sich in der Flächenmessung wider: Die Abnahme der Abrundungen im zeitlichen Verlauf von mit der YopP-Monosekretionsmutante inkubierten bzw. uninfinzierten Thrombozyten gehen mit einer deutlichen Flächenzunahme einher. Die mit der YopH, YopM, YopE und YopO-Monosekretionsmutante

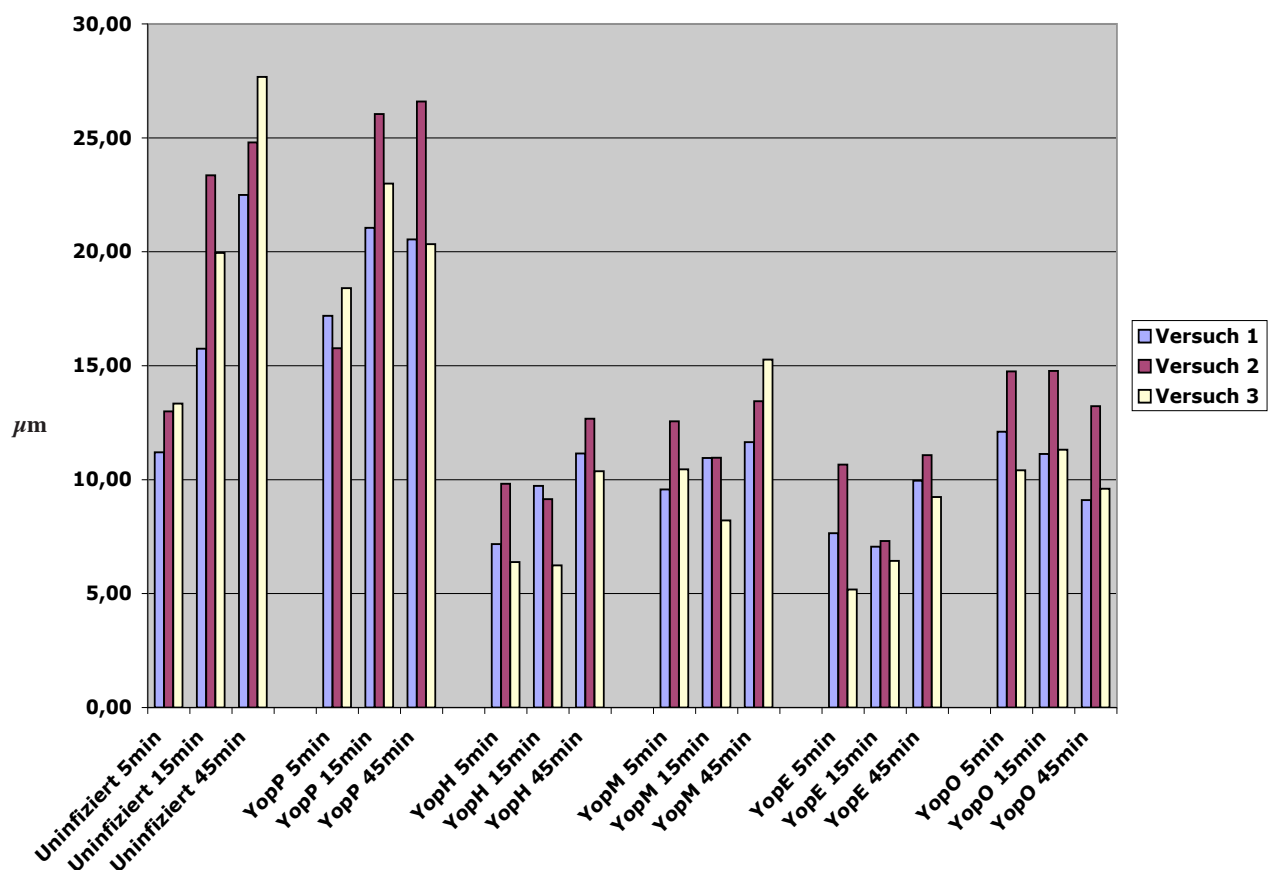


Abbildung 11: Uninfinzierte und mit der YopP-Monosekretionsmutante inkubierte Thrombozyten zeigen eine größere Zellfläche als mit der YopH, YopM, YopE, YopO-Monosekretionsmutante inkubierte Thrombozyten.

Thrombozyten wurden mit den jeweils angegebenen Yersinienstämmen inkubiert (MOI 1:100, 1h, 37°C), auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen zentrifugiert (1500rpm, 5min, 28°C) und zu den angegebenen Zeiten fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit einer Rhodamin/Phalloidin-Färbung dargestellt und die Präparate mit dem Mikroskop Olympus BX 61 photographiert. Von drei Versuchen werden die Zellkonturen von je 100 sich nicht berührenden Zellen markiert und mit der Software cell[^]p die Flächengröße ermittelt. Die Mittelwerte der Thrombozytenflächen in μm werden im Zeitverlauf für jeden Versuch dargestellt.

Variable	β -Parameter	p
Intercept	16,51515	< 0,0001
Uninfiziert	-4,60981	< 0,0001
YopH	-9,33271	< 0,0001
YopM	-6,26104	< 0,0001
YopE	-9,29214	< 0,0001
YopO	-4,70502	< 0,0001

Versuch 2	1,94599	< 0,0001
Versuch 3	-0,1192	0,7956

Ergebnis:R² = 15%

Yop	< 0,0001
Versuchsansatz	< 0,0001

a) Nach 5min zeigen sowohl die Yop-Monosekretionsmutanten als auch der Versuchsansatz einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Flächengröße von Thrombozyten.

Variable	β -Parameter	p
Intercept	22,5045	< 0,0001
Uninfiziert	-3,67669	< 0,0001
YopH	-14,98686	< 0,0001
YopM	-13,32027	< 0,0001
YopE	-16,42153	< 0,0001
YopO	-10,9518	< 0,0001

Versuch 2	2,65449	< 0,0001
Versuch 3	-0,08418	0,8691

Ergebnis:R² = 33%

Yop	< 0,0001
Versuchsansatz	< 0,0001

B) Nach 15min zeigen sowohl die Yop-Monosekretionsmutanten als auch der Versuchsansatz einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Flächengröße von Thrombozyten.

Variable	β -Parameter	p
Intercept	21,12508	< 0,0001
Uninfiziert	2,50616	0,0005
YopH	-11,09076	< 0,0001
YopM	-9,03299	< 0,0001
YopE	-12,39847	< 0,0001
YopO	-11,8452	< 0,0001

Versuch 2	2,82137	< 0,0001
Versuch 3	1,26634	0,0125

Ergebnis:R² = 32%

Yop	< 0,0001
Versuchsansatz	< 0,0001

c) Nach 45min zeigen sowohl die Yop-Monosekretionsmutanten als auch der Versuchsansatz einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Flächengröße von Thrombozyten.

Tabelle 17: Zu den Zeitpunkten 5min, 15min und 45min zeigen sowohl die Monosekretionsmutanten als auch die Versuchswiederholungen einen signifikanten Einfluss auf die Flächengröße von Thrombozyten.

Darstellung der statistischen Berechnung der Flächenmessung für 5min, 15min, 45min (a-c) mittels multipler linearer Regression. Als Referenz dienen YopP und Versuch 1, das Signifikanzniveau wird auf $\alpha=0,05$ festgelegt.

β -Parameter = Regressionskoeffizient β . R² = Bestimmtheitsmaß.

inkubierten Thrombozyten zeigen eine Dominanz von Abrundungen und eine kleinere Fläche. Sowohl die morphologische Differenzierung als auch die Flächengrößen der mit Monosekretionsmutanten inkubierten bzw. uninfizierten Thrombozyten bleiben im Zeitverlauf relativ stabil.

Zusammenfassend zeigt Abbildung 11, dass alle untersuchten Monosekretionsmutanten mit Ausnahme der YopP-Monosekretionsmutante einen vergleichbaren Effekt auf die Adhäsionsfähigkeit von Thrombozyten haben, nämlich, dass die Fläche und damit wahrscheinlich die Adhäsionsfähigkeit der Thrombozyten im Vergleich zu uninfizierten bzw. mit der YopP-Monosekretionsmutante inkubierten Thrombozyten abnimmt. Der Unterschied der Flächengröße zwischen mit der YopP-Monosekretionsmutante inkubierten und mit der YopH, YopM, YopE, YopO-Monosekretionsmutante inkubierten Thrombozyten könnte darauf hinweisen, dass es sich um Yop-spezifische Effekte auf das Zytoskelett handelt.

Um den Effekt der Monosekretionsmutanten auf die Thrombozytenfläche und gleichzeitig den Einfluß der drei Versuchsansätze, also die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, untersuchen zu können, wird die multiple lineare Regression eingesetzt (Tab. 17). Bei den Einflussgrößen dienen die YopP-Monosekretionsmutante und Versuch 1 als Referenz. Das Signifikanzniveau wird auf $\alpha=0,05$ festgelegt. Die multiple lineare Regression ergibt zu allen Zeitpunkten einen signifikanten Einfluss der Monosekretionsmutanten und des Versuchsansatzes auf die Größe der Zellfläche (Tab. 17). Der Anteil der erklärten Varianz an der Gesamtvarianz liegt zwischen 15-33%.

3.1.7 Untersuchung des Einflusses von *Yersinia*-Monodeletionsmutanten auf das Zytoskelett von Thrombozyten

Mulder et al. klonierten eine YopM-Monodeletionsmutante, indem sie statt YopM eine lacZYA-Sequenz 126 Basen nach dem Startcodon von YopM einführten (Stamm YopM- *Y. pestis* KIM8-3233 (pPCP1- pCD1[yopM::lacZYA])). Sie konnten nachweisen, dass Mäuse, die mit dieser Mutante infiziert wurden, länger überlebten als Vergleichstiere, die mit Wildtyp-Keimen infiziert worden waren (Mulder et al., 1989). Wie in Kapitel 3.1.4 dargestellt, zeigen mit der Monosekretionsmutante WA-C(pTRANS,pCJYM) inkubierte Thrombozyten eine gestörte Adhäsion auf Deckgläschen.

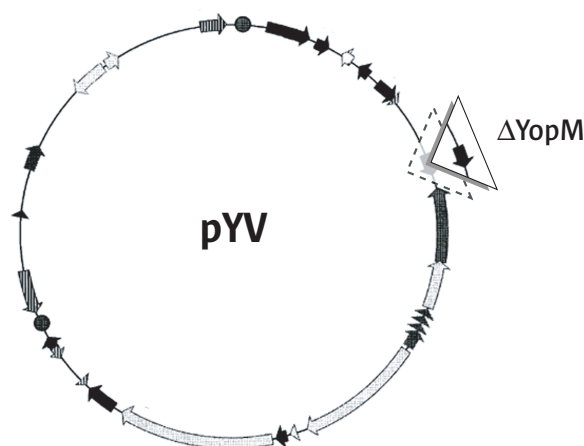


Abbildung 12:
Schematische Darstellung der verwendeten Monodeletionsmutante am Beispiel von Stamm WA-P(Δ YM).

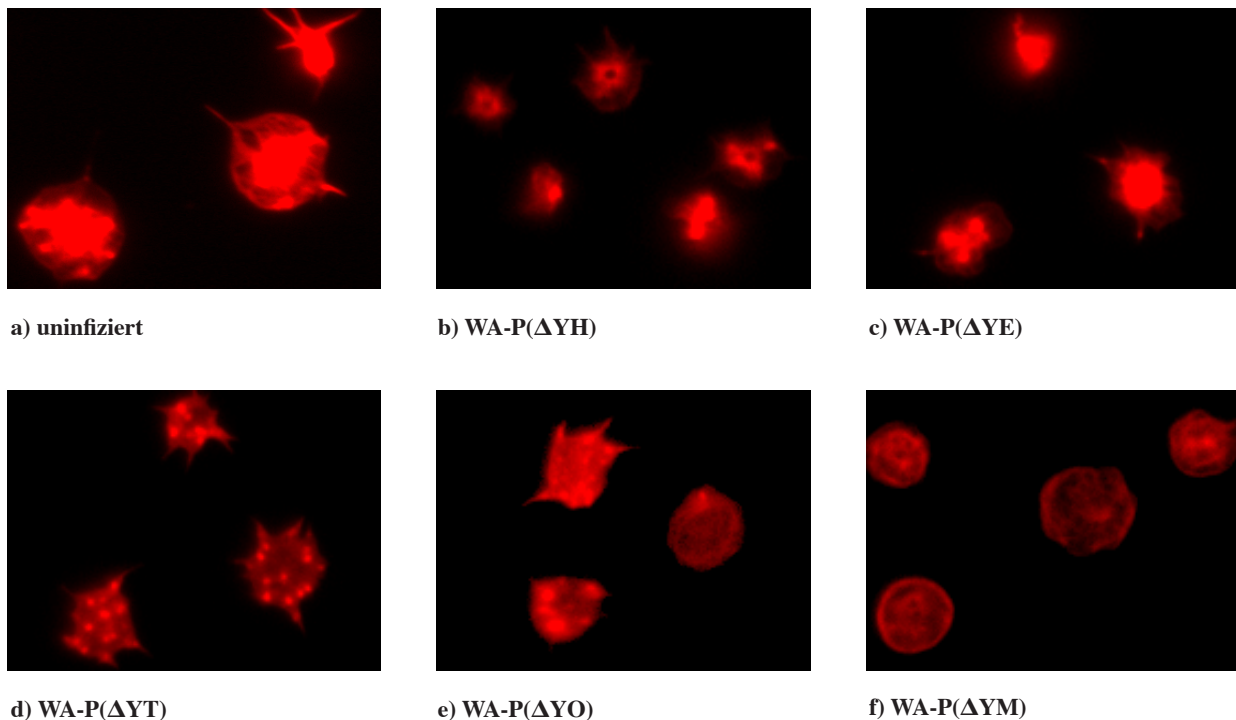


Abbildung 13: Mit den Monodeletionsmutanten WA-P(Δ YH), WA-P(Δ YE), WA-P(Δ YT), WA-P(Δ YO) inkubierte Thrombozyten zeigen Zytoskelettveränderungen, mit WA-P(Δ YM) inkubierte Thrombozyten zeigen kaum Veränderungen des Zytoskeletts.

Thrombozyten wurden in einer MOI von 1:100 45min bei 37°C mit WA-P(Δ YH), WA-P(Δ YE), WA-P(Δ YT), WA-P(Δ YO) oder WA-P(Δ YM) inkubiert (b-f) bzw. uninfiziert inkubiert (a), auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen zentrifugiert (1500rpm, 5min, 28°C) und nach 30min fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde in einer Rhodamin/Phalloidin-Färbung dargestellt.

Sollte bei einer Infektion mit *Yersinia spp.* YopM dazu beitragen, dass die Adhäsion und Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien gestört wird, könnte es zu einer verminderten Migrationsfähigkeit der infizierten Zelle kommen und somit zu einer verschlechterten Elimination des Erregers durch das Immunsystem. Um herauszufinden, ob YopM hauptverantwortlich für die Aktin-Zytoskelettveränderungen ist, sollten Thrombozyten mit der YopM-Monodeletionsmutante (WA-P(Δ YM)) und anderen Monodeletionsmutanten inkubiert werden, um zu untersuchen, ob es zu Zytoskelettveränderungen kommt und wie diese aussehen.

Bei den Monodeletionsmutanten handelt es sich um Yersinien des Stammes WA-P Serotyp 0:8, die das gesamte Virulenzplasmid außer dem jeweils angegebenen Yop enthalten (siehe Abb.12).

Thrombozyten wurden in einer MOI von 1:100 mit WA-P(Δ YT), WA-P(Δ YO), WA-P(Δ YE), WA-P(Δ YH) bzw. WA-P(Δ YM) für 45min bei 37°C in Suspension inkubiert, auf Deckgläschen zentrifugiert und nach 10min (nicht gezeigt) und 30min fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit Rhodamin/Phalloidin angefärbt.

Mit WA-P(Δ YT) inkubierte Thrombozyten sind etwas kleiner als uninfizierte Thrombozyten und zeigen viele Granula im Inneren der Zelle, die auf Zusammenlagerungen von Aktin-Zytoskelett hinweisen. Mit WA-P(Δ YO) inkubierte Thrombozyten besitzen Granula im Inneren der Zelle und

sind etwas kleiner als uninfizierte Thrombozyten. Thrombozyten inkubiert mit WA-P(Δ YE) sind kleiner als die Negativkontrolle und haben feine Ansätze von Filopodien und Lamellipodien. Mit WA-P(Δ YH) inkubierte Thrombozyten sind kleiner als die Negativkontrolle und zeigen vereinzelt feine Ansätze von Filopodien und Lamellipodien. Mit WA-P(Δ YM) inkubierte Thrombozyten zeigen eine ähnliche Größe wie uninfizierte Thrombozyten. Sie sind rund und besitzen nicht die typische Zytoskelettstruktur von Lamellipodien. Allgemein ist sichtbar, dass jede Monodeletionsmutante zu einer, im Vergleich zu uninfizierten Thrombozyten, veränderten Zellmorphologie führt.

Wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben, weisen mit der Monosekretionsmutante WA-C(pTRANS, pCJYM) inkubierte Thrombozyten eine gestörte Adhäsion auf. Mit der Monodeletionsmutante WA-P(Δ YM) inkubierte Thrombozyten zeigen eine gute Adhärenz und große Zellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass YopM einen Einfluss auf die Zytoskelettausbildung und Adhärenz der Zelle haben könnte.

3.1.8 Klonierung von WA-C(pTRANS,pCJYM-HA)

In Kapitel 3.1.4, 3.1.5 und 3.1.6 konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten, die mit der YopM-Monosekretionsmutante inkubiert wurden, Zytoskelettveränderungen aufweisen. Es sollte untersucht werden, ob diese durch eine intrazelluläre Wirkung von YopM zustande kommen. Dafür sollte untersucht werden, wo YopM während der Inkubation mit Thrombozyten detektiert werden kann. Die Zytoskelettveränderung könnte durch eine extrazelluläre oder durch eine intrazelluläre Wirkung von YopM in Thrombozyten zustande kommen. Ein unspezifischer Yersinieneffekt ist unwahrscheinlich, da dieser Effekt auch bei allen anderen Yop-Monosekretionsmutanten vorhanden sein müsste. Mit der YopP-Monosekretionsmutante inkubierte Thrombozyten zeigen aber, im Unterschied zu allen anderen untersuchten Yop-Monosekretionsmutanten, ein ähnliches Zytoskelett wie uninfizierte Thrombozyten (siehe 3.1.2, 3.1.5, 3.1.6).

In HeLa-Zellen konnte YopM intrazellulär fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden (Skrzypek et al., 1998), in Thrombozyten konnte YopM bisher nur elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden (Simonet et al., 1992). Um YopM in mit der YopM-Monosekretionsmutante inkubierten Thrombozyten fluoreszenzmikroskopisch spezifisch detektieren und lokalisieren zu können, wurde an den C-Terminus von YopM ein HA-Tag fusioniert. Dieser kann mit anti-HA-Antikörpern immunologisch detektiert werden (Maniattis et al., 1982). Zur Klonierung des Konstrukts (siehe Abb.14) dienten die Primer YopMHind3 und HAHind3. Das PCR-Produkt wurde in den mit Hind3 geschnittenen pACYC-Vektor ligiert und in die Yersinie WA-C(pTTSS), die nur das Lcr-Plasmid enthält, elektroporiert.

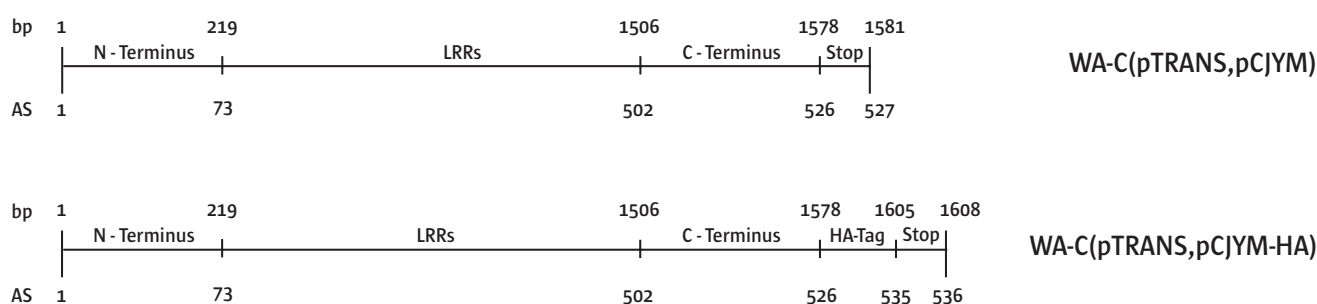


Abbildung 14: Schematische Darstellung des YopM-Gens mit und ohne HA-Tag von WA-C(pTRANS,pCJYM) und WA-C(pTRANS,pCJYM-HA), angelehnt an Evdokimov et al., 2001.

3.1.9 Lokalisation von YopM-HA nach Inkubation von Thrombozyten mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA)

Um YopM-HA nach Inkubation von Thrombozyten mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) zu lokalisieren, wurden Thrombozyten 60min in einer MOI von 1:100 mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) bzw. WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) in Suspension inkubiert, auf Deckgläschen zentrifugiert und nach 15min und 45min fixiert. Nach dem Fixieren wurde der HA-Tag mit anti-HA-Antikörpern, FITC markierten anti-Kaninchen-Antikörpern und das Zytoskelett mit Rhodamin/Phalloidin angefärbt. In den durchgeführten Versuchen bindet der anti-HA-Antikörper unspezifisch, das gesamte Präparat leuchtet grün (nicht gezeigt). Nach Änderung der Abfolge der Färbung und Änderung der Puffer war weiterhin eine unspezifische Bindung der anti-HA-Antikörper vorhanden. Da die Färbung auch zwischen den Thrombozyten vorhanden war, ist am ehesten davon auszugehen, dass eine unspezifische Interaktion mit Poly-L-Lysin, das die Deckgläschen benetzt, vorhanden sein könnte. Aus diesem Grund kann nicht gezeigt werden, ob YopM in Thrombozyten vorliegt oder nicht.

Da YopM intrazellulär in HeLa-Zellen nachgewiesen werden konnte (Skrzypek et al., 1998), sollten HeLa-Zellen mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) inkubiert werden um YopM-HA zu lokalisieren und das Zytoskelett zu untersuchen. Sollten sich in HeLa-Zellen nach Inkubation mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) Zytoskelettveränderungen zeigen, könnten diese darauf hindeuten, dass die Zytoskelettveränderungen in Thrombozyten YopM-spezifisch sein könnten.

3.2 Analyse der Interaktion zwischen dem *Yersinia*-YopM-Effektorprotein und HeLa-Zellen

HeLa-Zellen (humane Cervix-Karzinom-Zelllinie) sind größer als Thrombozyten und besitzen einen Kern. Durch diese Eigenschaften sollte es leichter sein, YopM-HA in HeLa-Zellen zu lokalisieren und eine Infektion fluoreszenzmikroskopisch nachzuweisen. Es sollte ausserdem untersucht werden, ob die Infektion von HeLa-Zellen mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) Zytoskelettveränderungen verursacht. Im Unterschied zu Thrombozyten werden HeLa-Zellen am Versuchsvorabend auf Deckgläschen pipettiert, damit sie ü.N. adhären können.

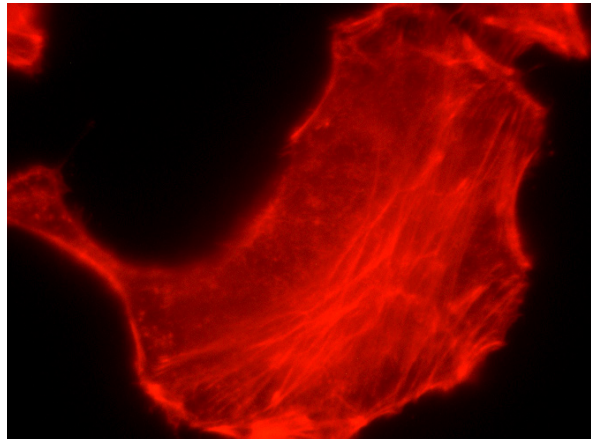
3.2.1 Lokalisation von YopM in infizierten HeLa-Zellen

Es sollte überprüft werden, ob WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) selektiv durch anti-HA-Antikörper immunologisch detektiert werden kann. Ausserdem sollte überprüft werden, ob der Stamm WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) sich auch in HeLa-Zellen als Kontrollstamm eignet. Da zur Lokalisation von YopM in HeLa-Zellen eine MOI von 1:20 ausreicht (Skrzypek et al., 1998), wurde von einer MOI 1:100 im IFT in Thrombozyten auf eine MOI von 1:50 reduziert.

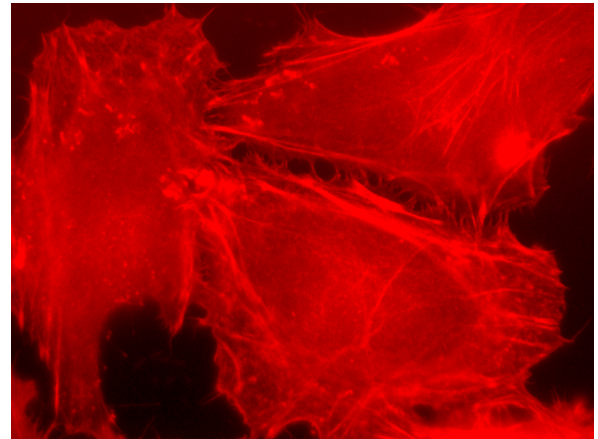
Adhärente HeLa-Zellen wurden in einer MOI von 1:50 mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) (Abb.15c-d), WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) (Abb.15b) bei 37°C für 2h infiziert bzw. uninfiziert (Abb.15a) belassen. Nach dem Fixieren wurde der HA-Tag mit anti-HA-Antikörpern, FITC markierten anti-Kaninchen-Antikörpern und das Zytoskelett mit Rhodamin/Phalloidin angefärbt.

Wie in Abb.15a dargestellt, haben adhärente uninfizierte HeLa-Zellen ein geordnetes dichtes Zytoskelett. Die mit WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) infizierten HeLa-Zellen (Abb.15b) bleiben adhären, sichtbar an dem geordneten dichten Zytoskelett. Sie sind vergleichbar mit uninfizierten

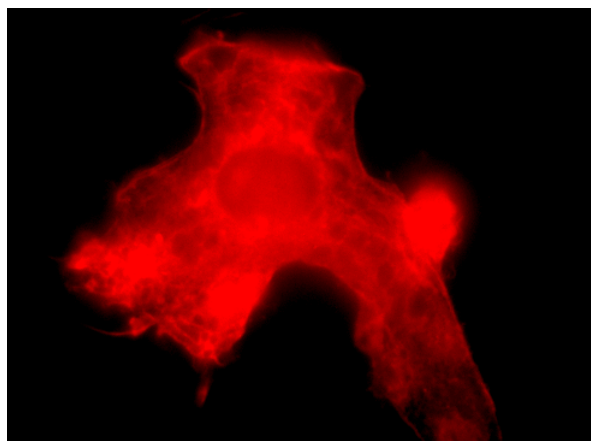
HeLa-Zellen (Abb.15a) und eignen sich deswegen auch in HeLa-Zellen als Negativkontrolle. Durch die selektive Anfärbung des HA-Tags an YopM (Abb.15d) kann gezeigt werden, dass die abgebildete Zelle mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infiziert ist. Nach 2h Infektionsdauer ist YopM-HA diffus im Zytoplasma nachweisbar, was die intrazelluläre Lokalisation von YopM beweist.



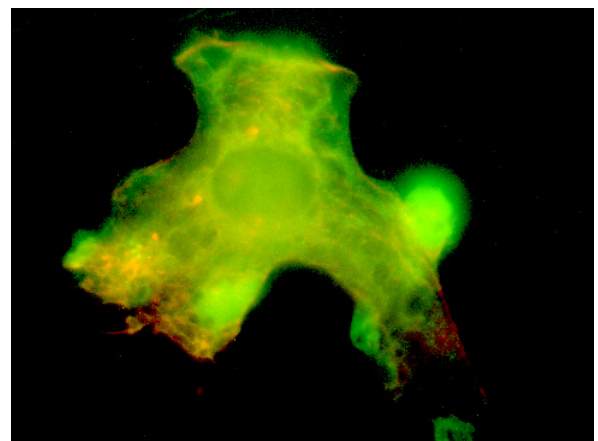
a) uninfiziert



b) WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP)



c) WA-C(pTRANS,pCJYM-HA)



d) WA-C(pTRANS,pCJYM-HA)

Abbildung 15: Infektion von HeLa-Zellen mit WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) führt zu keinen Zytoskelettveränderungen. Der HA-Tag an YopM kann in HeLa-Zellen spezifisch mit anti-HA-Antikörper angefärbt werden.

Adhärente HeLa-Zellen wurden für 2h bei 37°C in einer MOI von 1:50 mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) (c, d), WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) (b) infiziert bzw. uninfiziert belassen (a). Nach dem Fixieren wurden sie mit anti-HA-Antikörpern (1:50), FITC markierten anti-Kaninchen-Antikörpern (1:10.000) und Rhodamin/Phalloidin (1:100) angefärbt.

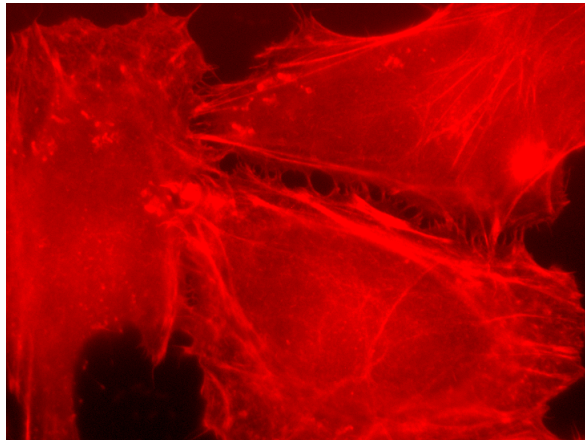
3.2.2 Untersuchung des Einflusses des YopM-Effektorproteins auf das Zytoskelett von HeLa-Zellen

Wie in Kapitel 3.1.4 dargestellt wurde, zeigen mit WA-C(pTRANS,pCJYM) inkubierte Thrombozyten eine gestörte Ausbildung des Zytoskeletts und eine verzögerte Adhäsion auf Deckgläschen. Deswegen sollte der Effekt von YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM) auf schon adhärente HeLa-Zellen untersucht werden. Skrzypek et al. konnten in mit *Y. pestis* (MOI 20:1) infizierten HeLa-Zellen YopM 2,5h nach der Infektion im Zytosol und 4h nach der Infektion im Zytosol und im Zellkern nachweisen (Skrzypek et al., 1998). Um die zeitabhängige Lokalisation von Yop M zu untersuchen, wurde in Anlehnung an die Versuche von Skrzypek et al. als Infektionsdauer 2h und 4h gewählt.

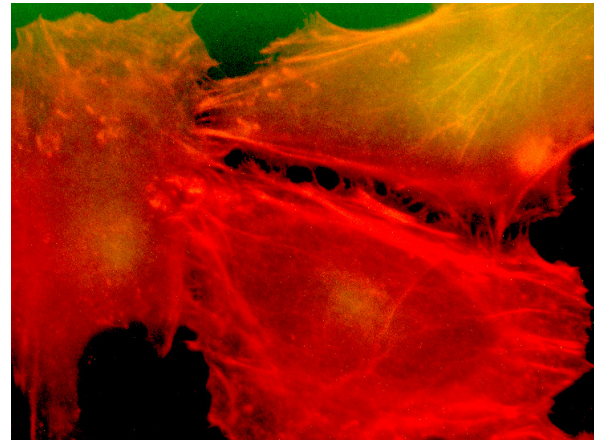
Adhärente HeLa-Zellen wurden in einer MOI von 1:50 mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) (Abb.16c-i) bzw. WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) (Abb.16a, b, j) bei 37°C für 2h (Abb.16a-d) bzw. 4h (Abb.16e-j) infiziert. Nach dem Fixieren wurde der HA-Tag mit anti-HA-Antikörpern, FITC markierten anti-Kaninchen-Antikörpern und das Zytoskelett mit Rhodamin/Phalloidin angefärbt.

In Abb.16a, b und j sind HeLa-Zellen, die entweder 2h (a, b) bzw. 4h (j) mit WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) infiziert wurden, dargestellt. In Abb.16c und d sind HeLa-Zellen dargestellt, die 2h bzw. in Abb.16e-i 4h mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infiziert wurden. Abb.16a, c, e, g und j sind im Rotfilter photographiert, Abb.16b, d, f, h und i im Mischfilter (rot-grün). Durch den Vergleich der Zellen in Abb.16b, d, f, h und i ist wieder gut erkennbar, dass der anti-HA-Antikörper spezifisch den HA-Tag in mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierten Zellen anfärbt. Die Anfärbung des HA-Tags an YopM in Abb.16d, f, h und i erlaubt die Auswahl von mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierten Zellen. An diesen kann das Zytoskelett und die genaue Lokalisation von Yop M untersucht werden.

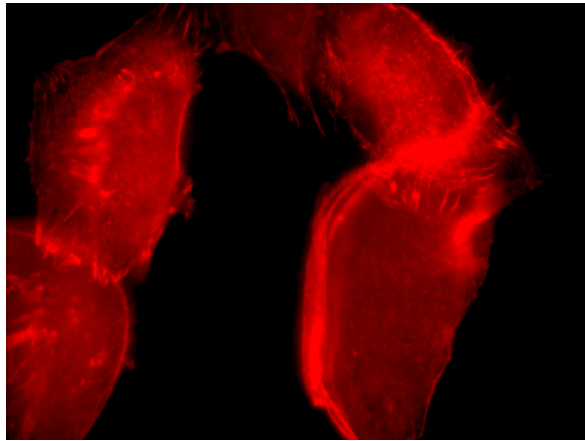
Nach 2h ist YopM diffus im Zytoplasma nachweisbar. Das Zytoskelett der Zelle ist ungeordnet aber die Zelle scheint adhärent zu bleiben (c, d). Nach 4h dominieren zwei verschiedene Zytoskelett-Morphologien von mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierten HeLa-Zellen das Bild. Entweder ist YopM zusätzlich zur Lokalisation im Zytoplasma v.a. im Zellkern lokalisiert und das Zytoskelett ist ungeordnet. Die Zellstrukturen werden „verschwommen“, sind aber noch gut sichtbar, was darauf hinweist, dass die Zelle nur locker an der Matrix adhärent ist (e, f). Oder die infizierte Zelle zeigt starke Zytoskelettveränderungen, die darauf hinweisen, dass die Zelle nicht mehr an der Matrix verankert ist, vereinbar mit einer Ablösung von den Deckgläschen (g-i). In diesem Stadium ist YopM in der ganzen Zelle und im Zellkern verteilt, meistens ist der Zellkern nicht mehr scharf abgrenzbar.



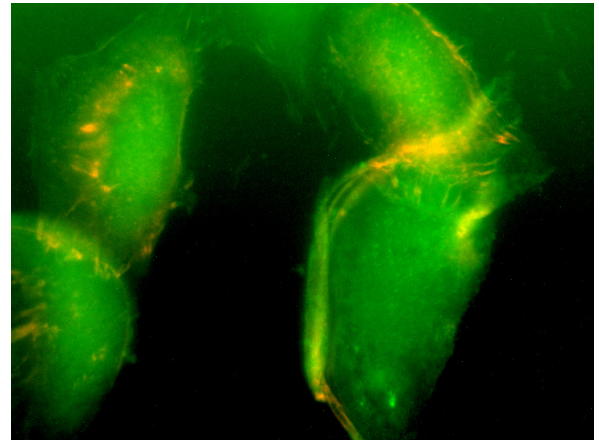
a) WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP), 2h



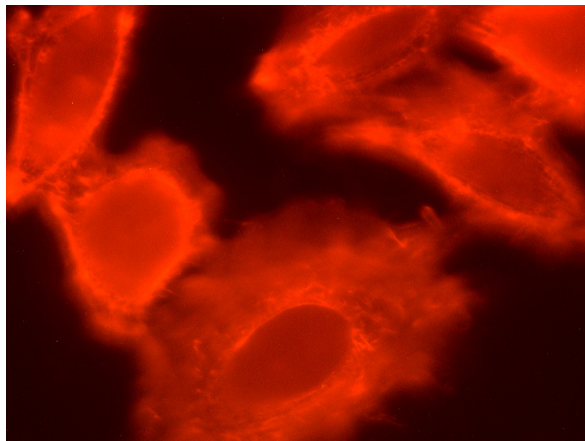
b) WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP), 2h, Mischfilter



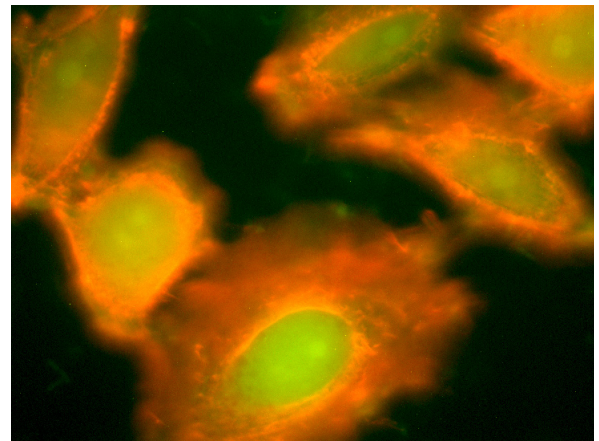
c) WA-C(pTRANS,pCJYM-HA), 2h



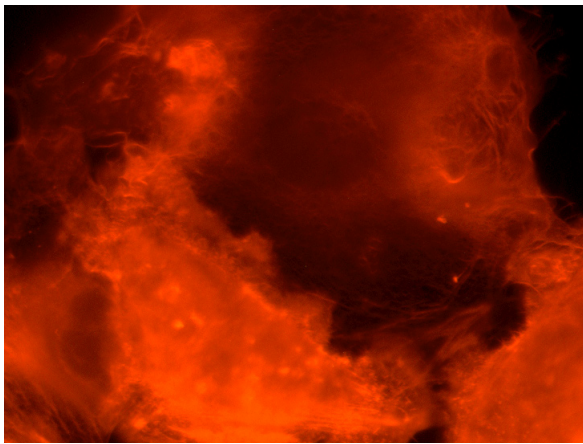
d) WA-C(pTRANS,pCJYM-HA), 2h



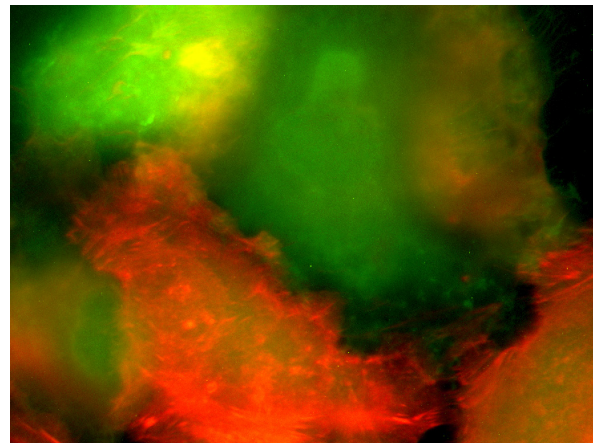
e) WA-C(pTRANS,pCJYM-HA), 4h



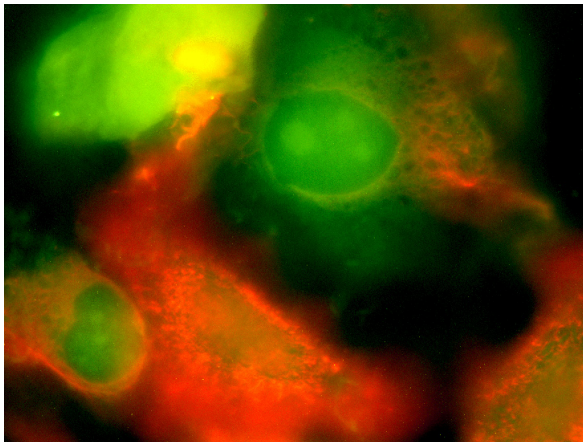
f) WA-C(pTRANS,pCJYM-HA), 4h



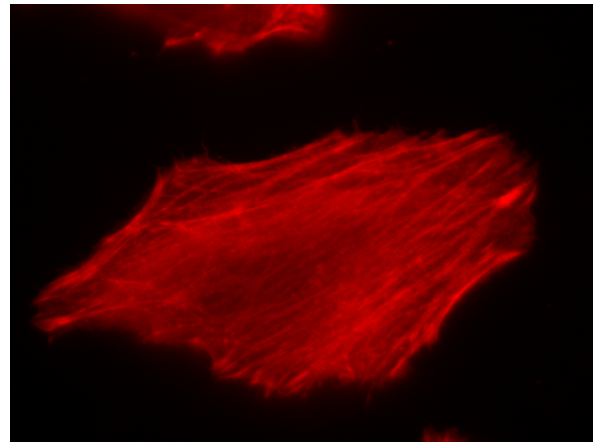
g) WA-C(pTRANS,pCJYM-HA), 4h



h) WA-C(pTRANS,pCJYM-HA), 4h



i) WA-C(pTRANS,pCJYM-HA), 4h



j) WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP), 4h

Abbildung 16: Mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierte HeLa-Zellen zeigen ein ungeordnetes Zytoskelett. YopM ist nach 2h diffus im Zytoplasma verteilt, nach 4h v.a. im Zellkern zu finden.

Adhärente HeLa-Zellen wurden für 2h (a-d) bzw. 4h (e-j) bei 37°C in einer MOI von 1:50 mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) bzw. WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) infiziert. Nach dem Fixieren wurde der HA-Tag an YopM mit anti-HA-Antikörpern (1:50), FITC markierten anti-Kaninchen-Antikörpern (1:10.000) und das Zytoskelett mit Rhodamin/Phalloidin (1:100) angefärbt.

3.2.3 Untersuchung des Einflusses des C-Terminus von YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) auf das Zytoskelett von HeLa-Zellen

In den N-terminalen AS von YopM ist die Sekretionsdomäne und die Translokationsdomäne zu finden. Zwischen dem N-Terminus und dem C-Terminus enthält YopM zahlreiche Leuzin-reiche Wiederholungssequenzen (leucine rich repeats, LRR) (Boland et al., 1996).

Es sollte untersucht werden, ob der C-Terminus für die beschriebenen Zytoskelettveränderungen und für die Lokalisation von mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierten Zellen verantwortlich ist. Deswegen wurde eine Deletionsmutante WA-C(pTRANS,pCJYM $_{\Delta 1506-1578}$ -HA) kloniert, der C-terminal 24 AS fehlen (siehe Abb.17). In Anlehnung an Evdokimov et al. (C-Terminus besteht aus 24 AS) (Evdokimov et al., 2001) ist davon auszugehen, dass durch diese Deletion der C-Terminus entfernt wurde. Als Primer dienten N-terminal YopMHind3 und C-terminal YopM $_{\Delta 1506-1578}$ -HA. Wegen der

zahlreichen Leuzin-reichen Wiederholungssequenzen hätten die Primer an anderen Stellen binden und nicht geplante Deletionen herbeiführen können, deswegen wurde WA-C(pTRANS, pCJYM Δ 1506-1578-HA) sequenziert mit Primer Seq1. Die Sequenzierung ergab ein mutationsfreies Konstrukt, dem genau 24 C-terminale AS fehlen

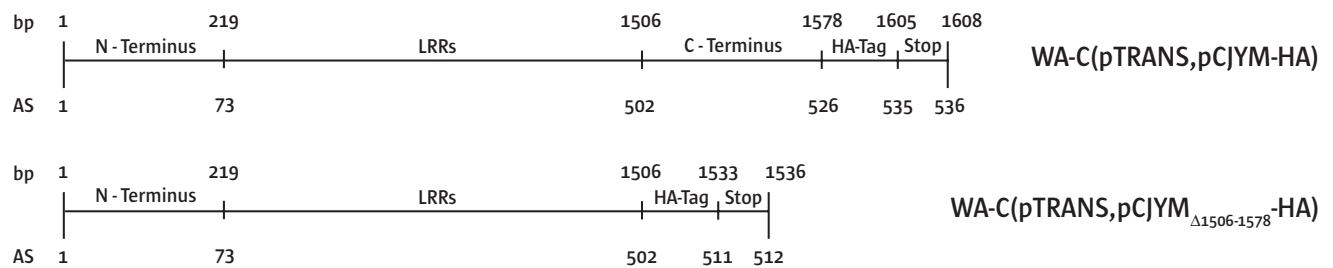


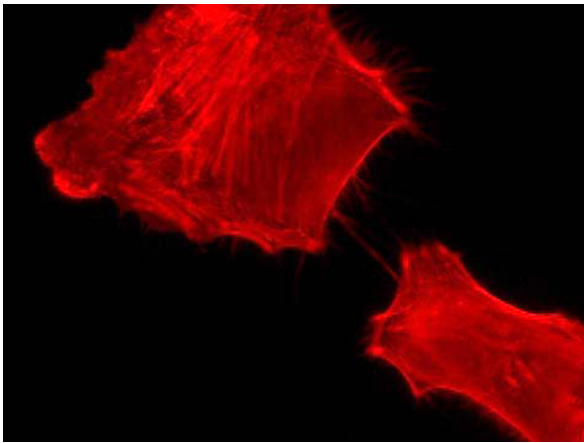
Abbildung 17: Schematische Darstellung des YopM-Gens mit HA-Tag von WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) und der C-terminalen Deletion des YopM-Gens mit HA-Tag von WA-C(pTRANS, pCJYM Δ 1506-1578-HA) angelehnt an Evdokimov et al., 2001.

Es sollte untersucht werden, ob WA-C(pTRANS,pCJYM Δ 1506-1578-HA) in HeLa-Zellen auch zu den durch WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) verursachten Zytoskelettveränderungen führt. Außerdem sollte untersucht werden, wo WA-C(pTRANS,pCJYM Δ 1506-1578-HA) in HeLa-Zellen lokalisiert werden kann.

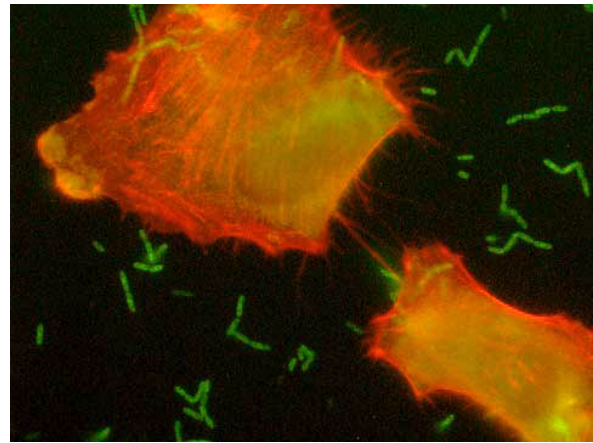
Hierfür wurden adhärenzte HeLa-Zellen mit WA-C(pTRANS,pCJYM Δ 1506-1578-HA) bzw. WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) in einer MOI von 1:50 bei 37°C für 1h (nicht gezeigt), 2h, 4h und 6h infiziert. Nach dem Fixieren wurde der HA-Tag an YopM mit anti-HA-Antikörpern, FITC markierten anti-Kaninchen-Antikörpern und das Zytoskelett mit Rhodamin/Phalloidin angefärbt.

In Abb.18a-f sind mit WA-C(pTRANS,pCJYM Δ 1506-1578-HA) infizierte HeLa-Zellen dargestellt. In Abb.18g-l sind mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierte HeLa-Zellen abgebildet.

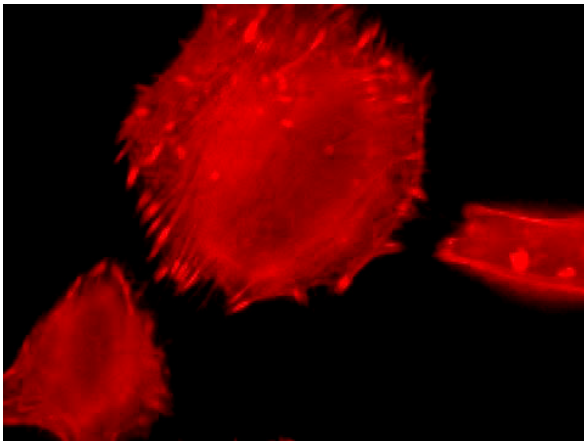
Das deletierte YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM Δ 1506-1578-HA) in den Zellen (Abb.18a-f) leuchtet zu allen Zeitpunkten schwächer als YopM in mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierten HeLa-Zellen (Abb.18g-l). Dafür sind viele induzierte Yersinien des Stammes WA-C(pTRANS,pCJYM Δ 1506-1578-HA) auf den Deckgläschen sichtbar, was zu der Vermutung führt, dass der Stamm wesentlich weniger Protein in die Zelle transloziert. Durch die Schwäche der Färbung kann YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM Δ 1506-1578-HA) nicht genau in der Zelle lokalisiert werden. Auffallend ist, dass sich auch nach 6h Infektionszeit mit WA-C(pTRANS,pCJYM Δ 1506-1578-HA) keine wesentlichen Zytoskelettveränderungen der infizierten HeLa-Zellen zeigen (Abb.18e-f).



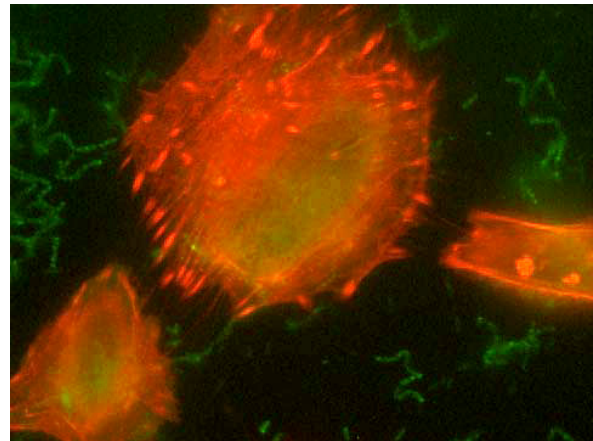
a) WA-C(pTRANS,pCJYM Δ 1506-1578-HA), 2h



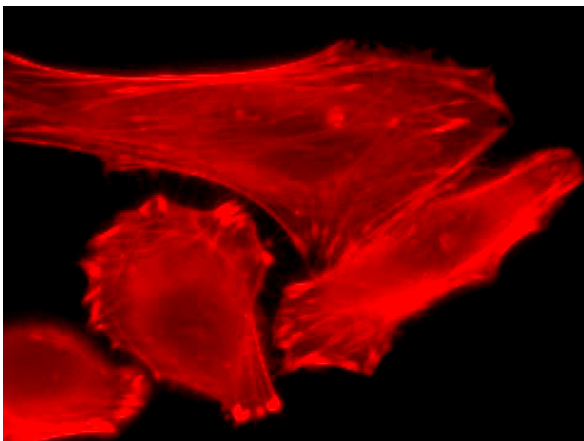
b) WA-C(pTRANS,pCJYM Δ 1506-1578-HA), 2h



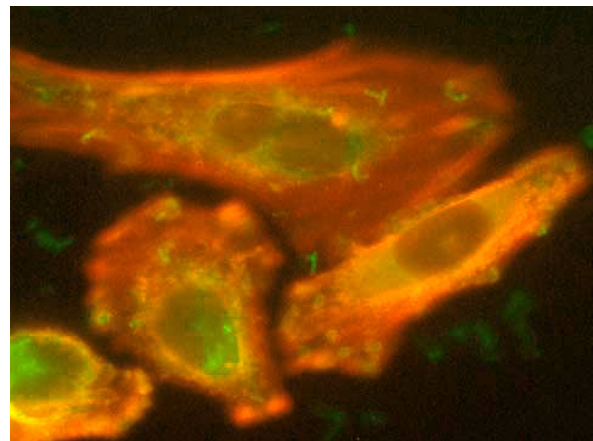
c) WA-C(pTRANS,pCJYM Δ 1506-1578-HA), 4h



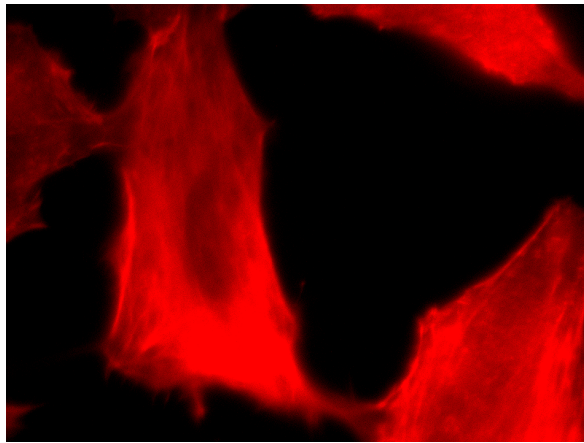
d) WA-C(pTRANS,pCJYM Δ 1506-1578-HA), 4h



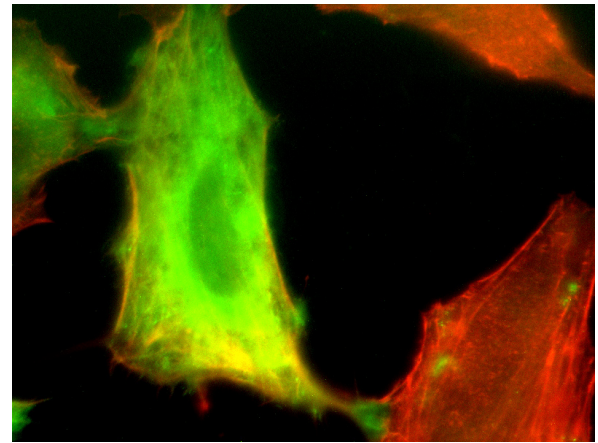
e) WA-C(pTRANS,pCJYM Δ 1506-1578-HA), 6h



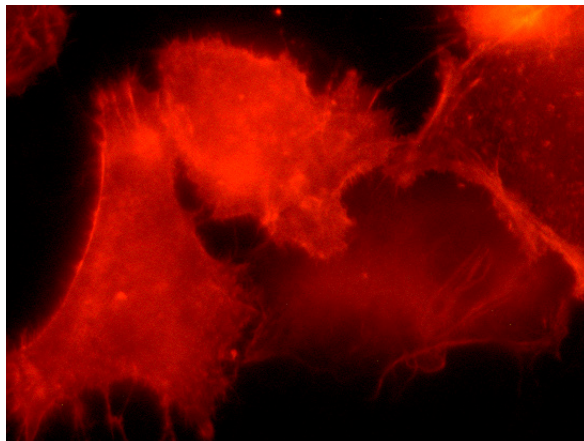
f) WA-C(pTRANS,pCJYM Δ 1506-1578-HA), 6h



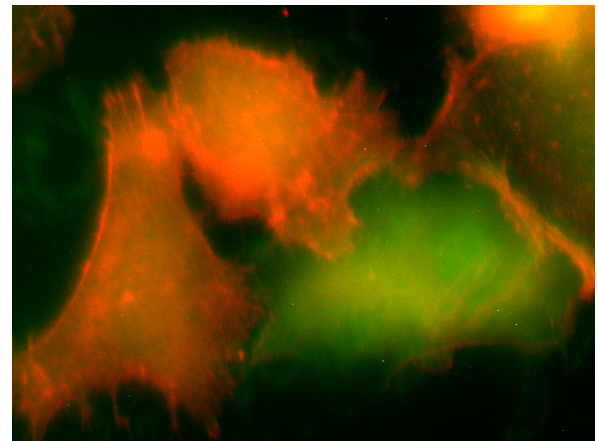
g) WA-C(pTRANS,pCJYM-HA), 2h



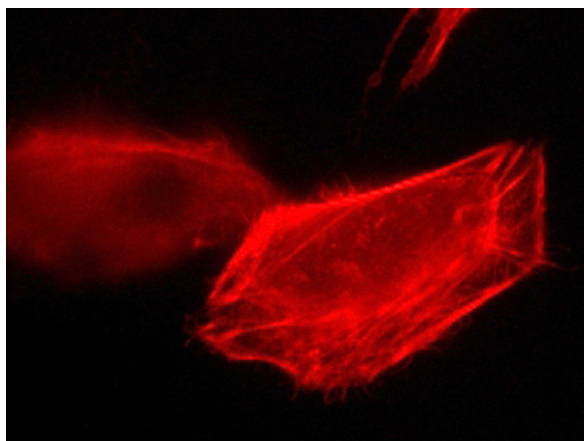
h) WA-C(pTRANS,pCJYM-HA), 2h



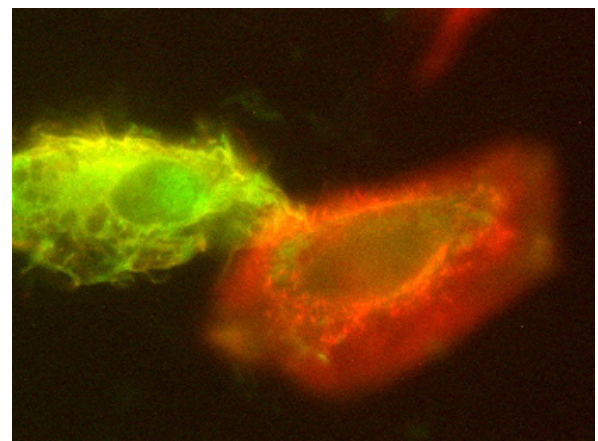
i) WA-C(pTRANS,pCJYM-HA), 4h



j) WA-C(pTRANS,pCJYM-HA), 4h



k) WA-C(pTRANS,pCJYM-HA), 6h



l) WA-C(pTRANS,pCJYM-HA), 6h

Abbildung 18: Im Gegensatz zu mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierten HeLa-Zellen zeigen mit WA-C(pTRANS,pCJYM Δ 1506-1578-HA) infizierte HeLa-Zellen keine Zytoskelettveränderungen. Adhärenente HeLa-Zellen wurden für 2h (a/b, g/h), 4h (c/d, i/j) und 6h (e/f, h/l) bei 37°C in einer MOI von 1:50 mit WA-C(pTRANS,pCJYM Δ 1506-1578-HA) (a-f) bzw. mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) (g-l) infiziert. Nach dem Fixieren wurde der HA-Tag an YopM mit anti-HA-Antikörpern (1:50), FITC markierten anti-Kaninchen-Antikörpern (1:10.000) und das Zytoskelett mit Rhodamin/Phalloidin (1:100) angefärbt.

3.3 Untersuchung der Interaktion zwischen Calpain und YopM

Der Effekt von YopM auf das Zytoskelett von Thrombozyten und HeLa-Zellen konnte in Kapitel 3.1.4, 3.1.5, 3.1.6 und 3.2.2 gezeigt werden. Um den Mechanismus, durch den YopM diese Zytoskelettveränderungen bewirken könnte, näher zu untersuchen, sollte ein Interaktionspartner von YopM identifiziert werden. Da Kaya et al. in einem Kongressbeitrag Daten zur *in vitro* Interaktion zwischen YopM und Calpain präsentierten (Kaya et al., Kongressbeitrag 2001) und die beobachteten Zytoskelettveränderungen zu den Funktionen von Calpain passen könnten, sollte dieser Interaktion nachgegangen werden.

3.3.1 Das Zytoskelett und die Rolle von Calpain

Bei der Zytoskelettausbildung, Zellaggregation und -adhärenz haben Calpain und seine Substrate wichtige regulierende Aufgaben. Calpain reguliert Aktin-Zytoskelett-Umbauprozesse bei endothelialen Wundheilungen und führt zur Ausbreitung von Fibroblasten durch Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien (Croce et al., 1999). Es wird betont, dass die Effekte von Calpain auf Migration und Zellausbreitung abhängig sind vom untersuchten Zelltyp (Perrin et al., 2002). Croce et al. beschreiben die morphologische Veränderung von Thrombozyten durch Inhibition von Calpain mit den spezifischen Inhibitoren Calpastatin und Calpeptin: Thrombozyten wurden 90min mit Calpastatin vorinkubiert, dann auf Deckgläschen gegeben und nach 20min fixiert. 50% der Thrombozyten sind rund, unausgebreitet und besitzen wenig oder keine Filopodien, die Lamellipodienausbildung fehlt. Dies weist darauf hin, dass Calpain in frühen Prozessen der Zellausbreitung wichtige Funktionen hat. Thrombozyten, die 10min mit Calpeptin vorinkubiert, dann auf Deckgläschen gegeben und nach 20min fixiert wurden, zeigen in 30% eine Hemmung der Zellausbreitung: die Zellen sind rund, unausgebreitet und besitzen keine Filopodien und keine Lamellipodien mehr (Croce et al., 1999).

3.3.2 Nachweis von Calpain in HeLa-Zellen

Zunächst sollte untersucht werden, ob Calpain in HeLa-Zellen (3.3.2) und in Thrombozyten (3.3.3) nachgewiesen werden kann.

Um Calpain aus HeLa-Zellen zu immunpräzipitieren, wurden zunächst Protein A Agarose-beads mit anti-Calpain-Antikörpern inkubiert. Hiermit wurden 1×10^7 lysierte HeLa-Zellen inkubiert (Spur Immunpräzipitation) und danach auf einem 10%-igen SDS-Gel aufgetrennt. Calpain wurde durch anti-Calpain-Antikörper detektiert.

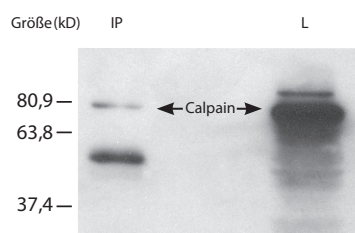


Abbildung 19: Calpain kann in HeLa-Zellen durch Immunpräzipitation nachgewiesen werden.

Anti-Calpain-Antikörper wurden mit Protein A-Agarosebeads unter Bewegung (1h, 4°C) inkubiert, zu 1×10^7 lysierten HeLa-Zellen gegeben und weiter inkubiert (1h, 4°C). Die Immunpräzipitation (IP) und das Lysat (L) wurden durch ein 10%-iges SDS-Gel aufgetrennt. Im Westernblot wurde Calpain über anti-Calpain-Antikörper (10 µg/ml) detektiert.

Die große Untereinheit von Calpain hat eine Größe um 80kD. In Abb.19 ist im Lysat (L) eine dicke Bande und in der Immunpräzipitation (IP) eine schmalere Bande um 80kD sichtbar. Das heißt, Calpain ist in nachweisbarer Menge in HeLa-Zellen vorhanden und kann immunpräzipitiert werden.

3.3.3 Nachweis der Calpain-Autodegradation in Thrombozyten

In Thrombozyten repräsentiert Calpain 2% des gesamten Proteins der Zelle (Croce et al., 1999). Wegen der großen Menge von Calpain in Thrombozyten, der genauen Charakterisierung durch viele Autoren und der bekannten Aktivierungs- und Inhibierungsbedingungen stellen Thrombozyten ein gut etabliertes zelluläres Modellsystem dar. Im unaktivierten Zustand kann die große Untereinheit von Calpain in der Größe von 80kD nachgewiesen werden. Wird Calpain aktiviert, kommt es zur Autodegradation der großen Untereinheit und zur Bildung von Spaltprodukten von 78kD (Intermediärstadium) und 76kD (vollständige Autodegradation) (Mukhopadhyay et al., 2001). Der verwendete Antikörper kann im Westernblot Calpain im unaktivierten Zustand in der Größe von 80kD und nach Aktivierung die Spaltprodukte von 78kD und 76kD nachweisen.

Um die Autodegradation von Calpain nachzuweisen, wurden Thrombozyten zur Aktivierung von Calpain mit Calcium-Ionophor und zur Hemmung von Calpain mit Calpeptin bzw. den hemmenden Substanzen EGTA und MgCl_2 inkubiert (Schoenwaelder et al., 1997). Das hier verwendete Calcium-Ionophor (A23187, Calbiochem) ist ein kleines antipathisches Molekül, welches den Transport von Calciumionen von der wässrigen Lösung in eine hydrophobe Phase (durch die Zellwand in die Zelle) fördert. Es funktioniert durch Ionenaustausch: für jedes Ca^{2+} , das in die Zelle transportiert wird, werden zwei H^+ -Ionen aus der Zelle hinaustransportiert.

Thrombozyten wurden 45min bei 37°C inkubiert, bevor sie zur Aktivierung von Calpain mit 1mg/ml Fibrinogen, 1mM CaCl_2 und 1µM Calcium-Ionophor bzw. zur Hemmung von Calpain mit 1mg/ml Fibrinogen, 1mM EGTA, 2mM MgCl_2 und 1µM Calcium-Ionophor 60min bei RT inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen lysiert, zentrifugiert und der Überstand mit Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden auf einem 8%-igen SDS-Gel aufgetrennt und Calpain mit anti-Calpain-Antikörpern detektiert.

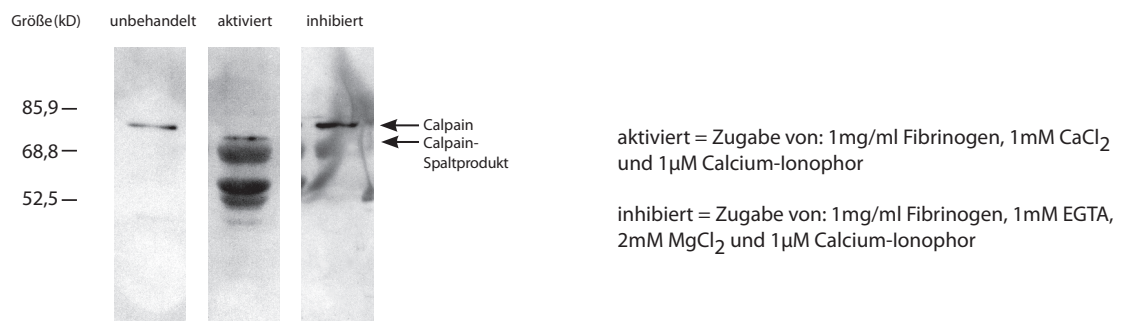


Abbildung 20: Calpain kann in Thrombozyten nachgewiesen und aktiviert bzw. inhibiert werden.

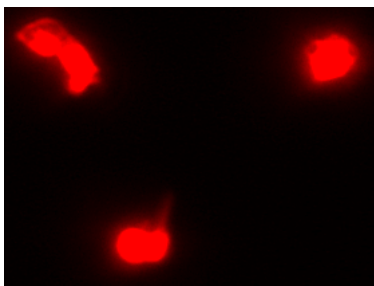
3×10^8 Thrombozyten wurden 45min bei 37°C inkubiert, anschließend wurde Calpain mit den angegebenen Substanzen entweder aktiviert oder gehemmt (60min, RT). Nach der Lyse wurde zentrifugiert (4°C, 20min, 16.000g), der Überstand mit Probenpuffer versetzt und auf einem 8%-igen SDS-Gel aufgetrennt. Detektion von Calpain mit anti-Calpain-Antikörper (10g/ml) und anti-Kaninchen-Antikörper (1:10.000).

Wie in Abb.20 gezeigt, ist in Spur 1 das unbehandelte Calpain bei 80kD zu sehen. In Spur 2 ist das Spaltprodukt von Calpain bei 76 kD sichtbar, die darunter liegenden Banden sind durch Fibrinogen verursacht. In Spur 3 ist inhibiertes Calpain bei 80kD dargestellt, die Fibrinogen-Banden sind hier auch vorhanden aber verlaufen. Calpain kann unter diesen Bedingungen in Thrombozyten nachgewiesen, aktiviert und inhibiert werden. Die Aktivierung von Calpain ist durch die Autodegradation mit dem Nachweis der Spaltprodukte gut nachweisbar. Zwischen unbehandeltem Calpain und gehemmten Calpain ist keine Unterscheidung möglich.

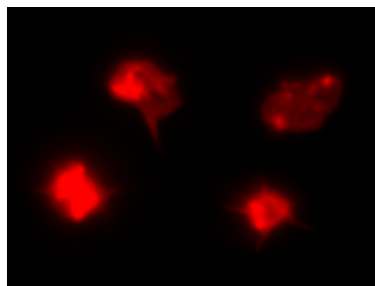
3.3.4 Untersuchung des Einflusses von Calpeptin und YopM auf das Zytoskelett von Thrombozyten

Nachdem gesichert war, dass Calpain in HeLa-Zellen und in Thrombozyten nachweisbar ist, sollte die fragliche Interaktion zwischen YopM und Calpain zunächst morphologisch untersucht werden. So sollte überprüft werden, ob die mit dem zellpermeablem Calpaininhibitor Calpeptin inkubierten Thrombozyten eine morphologische Ähnlichkeit zu denen mit WA-C(pTRANS,pCJYM) inkubierten haben. Thrombozyten wurden deshalb in Suspension für 10min mit 100 μ g/ml Calpeptin bei RT inkubiert, auf Deckgläschen zentrifugiert und nach 10min fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit Rhodamin/Phalloidin dargestellt.

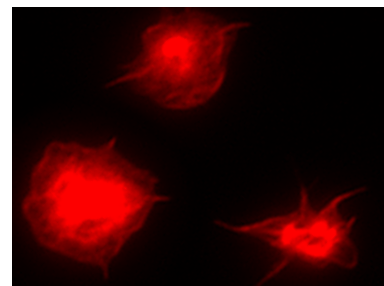
Die mit Calpeptin inkubierten Thrombozyten zeigen eine schlechte Adhäsion auf den Deckgläschen, sichtbar an der fehlenden Filopodienausbildung und fehlenden Ausbreitung der Zelle. Die Zellen, in denen durch Calpeptin Calpain inhibiert wurde, zeigen demnach eine morphologische Ähnlichkeit zu mit WA-C(pTRANS,pCJYM) inkubierten Thrombozyten. Diese gestörte Adhäsion der Thrombozyten könnte auf eine Hemmung von Calpain hinweisen (Croce et al., 1999).



a) Inkubation mit 100 μ g/ml Calpeptin für 10min



b) Inkubation mit WA-C (pTRANS,pCJYM) für 1h, MOI 1:100



c) uninferiert

Abbildung 21: Mit YopM inkubierte Thrombozyten zeigen morphologische Ähnlichkeiten zu mit Calpeptin vorinkubierten Thrombozyten.

Alle Proben wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen zentrifugiert und nach 10min fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde in einer Rhodamin/Phalloidin-Färbung dargestellt.

3.3.5 Untersuchung des Einflusses von Calpeptin und YopM auf das Zytoskelett von HeLa-Zellen

Es sollte überprüft werden, ob die beobachtete Ähnlichkeit der Zytoskelettveränderungen von mit Calpeptin inkubierten zu mit WA-C(pTRANS,pCJYM) inkubierten Thrombozyten auch in HeLa-Zellen beobachtet werden kann. Außerdem sollten HeLa-Zellen zusätzlich zur Inkubation mit Calpeptin mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infiziert werden um zu untersuchen, ob der Effekt von Calpeptin am Zytoskelett durch YopM verstärkt, nicht beeinflusst oder aufgehoben wird.

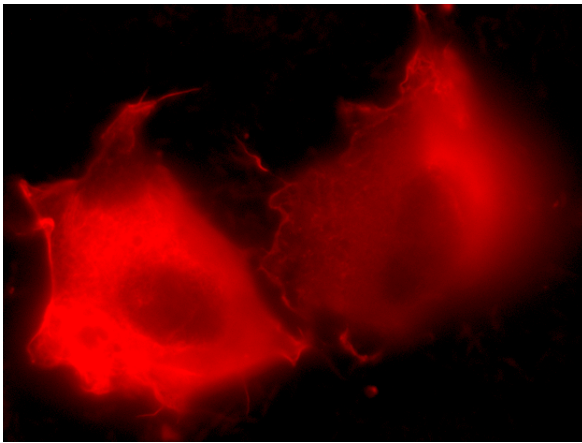
Hierfür wurden schon ausgesäte HeLa-Zellen mit $20\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in DMSO gelöstem Calpeptin bzw. als Negativkontrolle mit DMSO inkubiert und gleichzeitig 4h mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) bzw. WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) in einer MOI von 1:50 infiziert. Der HA-Tag wurde mit anti-HA-Antikörpern, FITC markierten anti-Kaninchen-Antikörpern und das Zytoskelett mit Rhodamin/Phalloidin angefärbt.

Adhärente HeLa-Zellen, die mit WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) infiziert und DMSO inkubiert wurden (Abb.22f), zeigen ein geordnetes Zytoskelett und bleiben auf den Deckgläschen gut adhärent. Diese Zellen ähneln uninfizierten und nicht mit DMSO inkubierten HeLa-Zellen (nicht gezeigt) und eignen sich deshalb gut als Negativkontrolle. HeLa-Zellen, die mit WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) infiziert und Calpeptin inkubiert wurden (Abb.22e), bleiben noch adhärent, zeigen aber ein fransiges Zytoskelett mit aufgetriebenen Ausläufern.

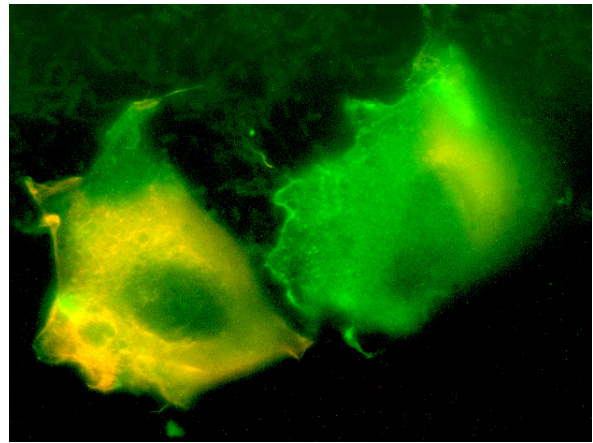
Uninfizierte HeLa-Zellen, die mit Calpeptin inkubiert wurden (Abb.22g), zeigen eine gestörte Zytoskelettausbildung und scheinen nicht mehr fest an der Matrix adhärent zu sein.

Mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierte und DMSO inkubierte HeLa-Zellen (Abb.22c, d) lösen sich von der extrazellulären Matrix, sichtbar am ungeordneten Zytoskelett mit kurzen Zellausläufern. Die Zerstörung des Zytoskeletts mit Ablösung von den Deckgläschen scheint bei mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierten und DMSO inkubierten HeLa-Zellen (Abb.22c, d) größer zu sein als bei mit WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) infizierten und Calpeptin inkubierten Zellen (Abb.22e).

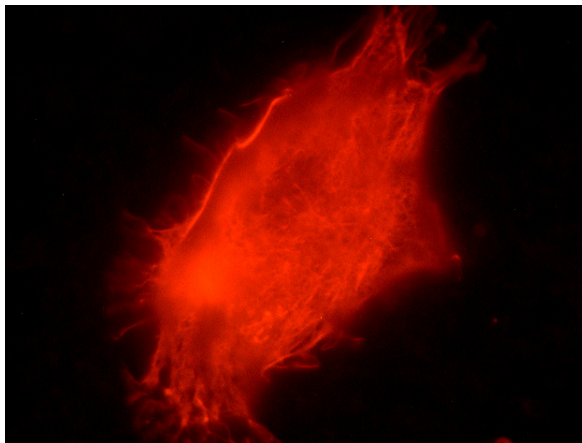
Werden HeLa-Zellen mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infiziert und mit Calpeptin inkubiert (Abb.22a, b), haben sie eine morphologische Ähnlichkeit zu mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierten und DMSO inkubierten HeLa-Zellen (Abb.22c, d). Die zusätzliche Behandlung von mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierten HeLa-Zellen mit Calpeptin scheint zu keiner zusätzlichen Verschlechterung des Zustandes des Zytoskeletts und zu keiner Verschlechterung der Adhärenz der Zelle zu führen.



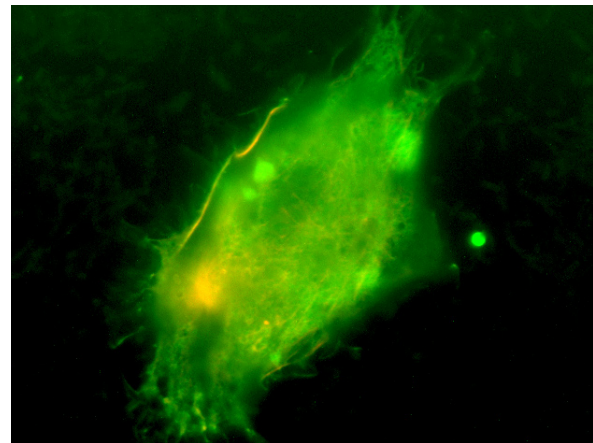
a) WA-C(pTRANS,pCJYM-HA), Calpeptin



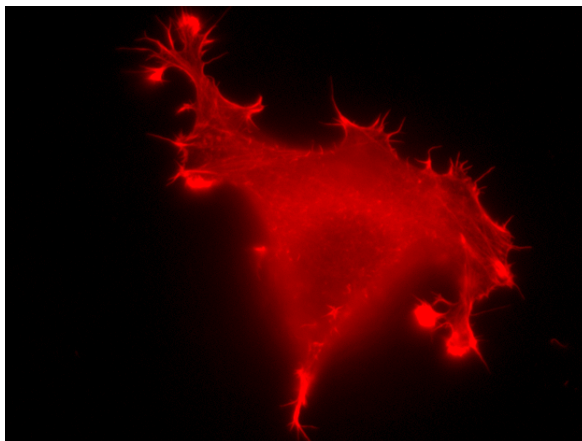
b) WA-C(pTRANS,pCJYM-HA), Calpeptin



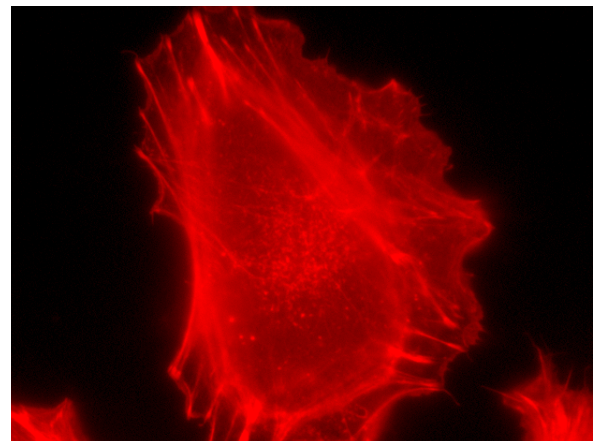
c) WA-C(pTRANS,pCJYM-HA), DMSO



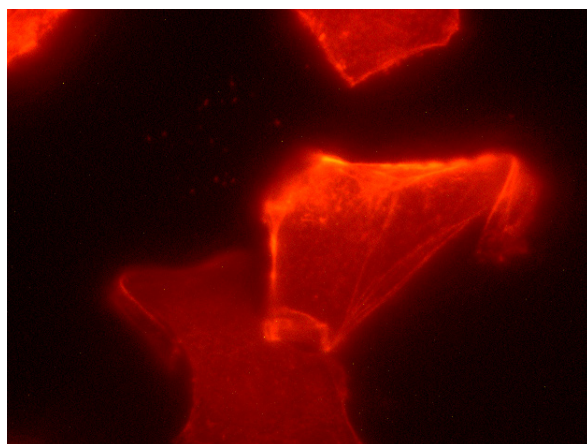
d) WA-C(pTRANS,pCJYM-HA), DMSO



e) WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP), Calpeptin



f) WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP), DMSO



g) uninferiert, Calpeptin

Abbildung 22: Calpeptin führt zur verschlechterten Adhärenz von HeLa-Zellen (g). Die zusätzliche Behandlung von mit WA-C(pTRANS, pCJYM-HA) infizierten HeLa-Zellen mit Calpeptin führt zu keiner sichtbaren zusätzlichen Verschlechterung des Zustandes des Zytoskeletts oder Verschlechterung der Adhärenz der Zelle (a/b bzw. c/d).

HeLa-Zellen wurden 4h mit $20\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Calpeptin und WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) bzw. WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) in einer MOI von 1:50 inkubiert. Detektion über anti-HA-Antikörper (1:50), FITC markierte anti-Kaninchen-Antikörper (1:10.000) und Rhodamin/Phalloidin (1:100).

3.3.6 Untersuchung der Interaktion zwischen Calpain und YopM *in vivo* in HeLa-Zellen

In Kapitel 3.3.4 und 3.3.5 konnte eine Ähnlichkeit der Zytoskelettveränderungen von mit Calpeptin inkubierten zu mit WA-C(pTRANS,pCJYM) inkubierten Thrombozyten und HeLa-Zellen gezeigt werden. Da die Infektion von HeLa-Zellen als Modellsystem für Yersinieninfektionen gut etabliert ist, sollte die mögliche Interaktion von YopM mit Calpain mit Hilfe einer Koimmunpräzipitation in HeLa-Zellen *in vivo* überprüft werden. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass der anti-HA-Antikörper Yop M-HA zuverlässig präzipitiert (nicht gezeigt). Als Negativkontrolle wurde der Stamm WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) verwendet.

HeLa-Zellen wurden in einer MOI von 1:30 mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) bzw. WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) für 45min infiziert und lysiert. Ein Teil des Lysates wurde mit an Protein A Agarose-beads immobilisierte anti-Calpain-Antikörper, immobilisierte anti-HA-Antikörper bzw. mit Protein A Agarose-beads ohne immobilisierte Antikörper inkubiert, gewaschen, und in Probenpuffer aufgenommen (= Immunpräzipitat). Die Proben wurden auf einem 8%-igen SDS-Gel aufgetrennt und eine Immundetektion auf YopM mit anti-YopM-Antikörpern durchgeführt.

Abbildung 23 zeigt die Versuche der Koimmunpräzipitation von YopM über an Agarose-beads immobilisierte anti-Calpain-Antikörper, immobilisierte anti-HA-Antikörper bzw. mit Protein A Agarose-beads ohne immobilisierte Antikörper. Detektierende Antikörper im Westernblot sind anti-YopM-Antikörper. Spur 1-4 zeigen das Lysat bzw. die Immunpräzipitate von mit WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) infizierten HeLa-Zellen. Es ist wie erwartet keine YopM-Bande sichtbar. Die im Lysat sichtbare Bande auf Höhe von YopM ist kleiner als 60kD und auch im Lysat von mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierten HeLa-Zellen (Spur 5) zu sehen (in der hier gezeigten Abbildung durch die starke YopM-Bande nicht einzeln sichtbar). Spur 5-8 zeigen das Lysat bzw. die Immunpräzipitate von mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierten HeLa-Zellen. In Spur 5 ist das Lysat aufgetragen, bei dem eine breite YopM-Bande sichtbar ist. Spur 6 zeigt die Immunpräzipitation mit Protein A Agarose-beads ohne immobilisierte Antikörper. Hier ist eine schwache Bande auf Höhe von YopM zu sehen. Dieses deutet auf eine unspezifische Bindung von YopM an die Agarose-beads hin. Spur 7 zeigt die Immunpräzipitation mit an Beads immobilisierte anti-Calpain-Antikörper. Auch hier

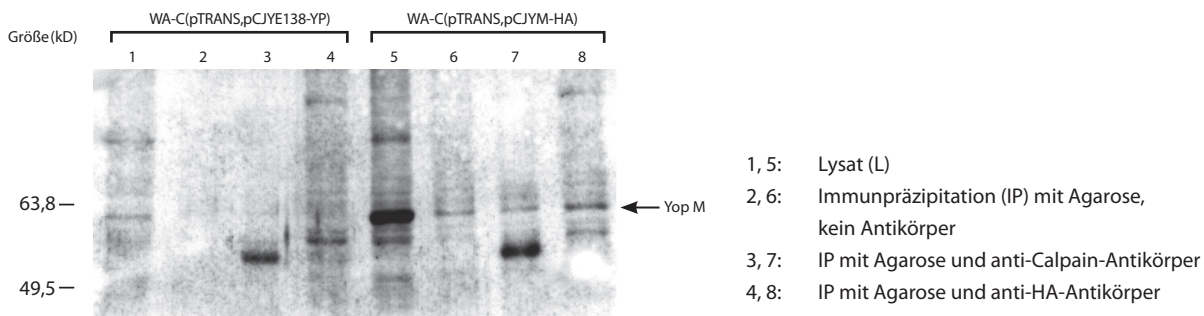


Abbildung 23: YopM bindet unspezifisch an Agarose-Beads.

1×10^7 HeLa-Zellen wurden mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) bzw. WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) 45min in einer MOI von 1:30 infiziert, anschließend 30min unter Bewegung lysiert (Lysat). Nach kurzem Zentrifugieren wurde das Lysat zu an Protein A Agarose-beads immobilisierte anti-Calpain-Antikörper (Spur 3, 7), immobilisierte anti-HA-Antikörper (Spur 4, 8) bzw. an Protein A Agarose-beads ohne immobilisierte Antikörper (Spur 2, 6) gegeben und weiter inkubiert (1h, 4°C). Die Proben wurden auf einem 8%-igen SDS-Gel aufgetrennt, anschließend Immundetektion von YopM mit anti-YopM-Antikörpern (1:5000).

ist eine schwache Bande von YopM sichtbar. Die Bandenstärke ist im Vergleich zur Bande mit der unspezifischen Bindung von YopM an die Beads (Spur 6) ähnlich, so dass eine zusätzliche spezifische Bindung von YopM über Calpain an die anti-Calpain-Antikörper unwahrscheinlich erscheint. Spur 8 zeigt die Immunpräzipitation mit an Beads immobilisierte anti-HA-Antikörper. Der HA-Tag hängt an YopM, so dass zusätzlich zur unspezifischen Bindung eine weitere spezifische Bindung über die anti-HA-Antikörper zustande kommt. Dies erklärt die intensivere YopM-Bande in Spur 8, die in zwei von drei Versuchen nachweisbar ist.

Abbildung 24 zeigt den Versuch der Koimmunpräzipitation von YopM über immobilisierte anti-Calpain-Antikörper, immobilisierte anti-HA-Antikörper bzw. mit Protein A Agarose-beads ohne immobilisierte Antikörper. Detektierende Antikörper für den Blot sind anti-Calpain-Antikörper. Spur 1-4 zeigen das Lysat bzw. die Immunpräzipitate von mit WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) infizierten HeLa-Zellen, Spur 5-8 zeigen das Lysat bzw. die Immunpräzipitate von mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierten HeLa-Zellen.

In Spur 1 und 5 sind jeweils Lysate aufgetragen, in denen Calpain nachweisbar ist. Calpain ist in Spur 1 sehr viel schwächer als in Spur 5. Da die Calpain-Bande in Spur 3 auch viel schwächer ist als in Spur 7, kann davon ausgegangen werden, dass eine ungleiche anfängliche HeLa-Zellzahl vorlag. In Spur 3 und 7 sind die Immunpräzipitate von mit an Beads immobilisierte anti-Calpain-Antikörper aufgetragen, hier ist die Calpain-Bande sichtbar. In Spur 2 und 6 fehlen die immunpräzipitierenden Antikörper, es zeigt sich keine Calpain-Bande. In Spur 4 sind die Immunpräzipitate (mit WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) infizierte Zellen) mit an Beads immobilisierte anti-HA-Antikörper aufgetragen, es ist keine Calpain-Bande sichtbar. Spur 8 zeigt die Immunpräzipitation von mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierten HeLa-Zellen mit an Beads immobilisierte anti-HA-Antikörper. An den immobilisierten anti-HA-Antikörpern sollte der HA-Tag von YopM binden. Würde YopM an Calpain binden, sollte hier eine Bande sichtbar sein. Da hier keine Bande sichtbar ist, ist dies mit dem in Abb.23 dargestellten Ergebnis ein weiterer Hinweis darauf, dass YopM nicht an Calpain bindet.

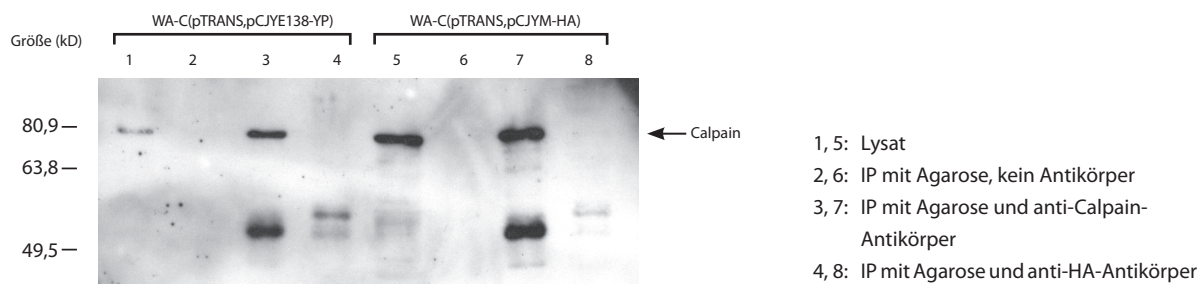


Abbildung 24: Calpain bindet sehr spezifisch an anti-Calpain-Antikörper und offensichtlich nicht an YopM. 1×10^7 HeLa-Zellen wurden mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) bzw. WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) 45min in einer MOI von 1:30 infiziert, anschließend 30min unter Bewegung lysiert (Lysat). Nach kurzem Zentrifugieren wurde das Lysat zu an Protein A Agarose-beads immobilisierte anti-Calpain-Antikörper (Spur 3, 7), immobilisierte anti-HA-Antikörper (Spur 4, 8) bzw. an Protein A Agarose-beads ohne immobilisierte Antikörper (Spur 2, 6) gegeben und weiter inkubiert (1h, 4°C). Die Proben wurden auf einem 8%-igen SDS-Gel aufgetrennt, anschließend Immundetektion von Calpain mit anti-Calpain-Antikörpern (10µg/ml).

3.4 Untersuchung des funktionellen Einflusses von YopM auf Calpain

In den oben dargestellten Koimmunpräzipitationsversuchen konnte kein Hinweis dafür gefunden werden, dass YopM an Calpain bindet. Wenn in Koimmunpräzipitationsversuchen Calpain nicht als Interaktionspartner von YopM nachgewiesen werden kann, ist nicht ausgeschlossen, dass die Ergebnisse von Kaya et al. zutreffen, da es sein könnte, dass z.B. die Bedingungen nicht richtig gewählt wurden. Um eventuell bestehende funktionelle Einflüsse von YopM auf Calpain zu untersuchen, wurden Thrombozyten mit WA-C(pTRANS,pCJYM) inkubiert und Calpain gleichzeitig aktiviert bzw. inhibiert.

3.4.1 Aktivierung und Inhibition von Calpain in mit Yop-Monosekretionsmutanten inkubierten Thrombozyten

Wie in 3.3.4 gezeigt werden konnte, besitzen die Zellen, in denen durch Calpeptin Calpain inhibiert wurde, eine morphologische Ähnlichkeit zu mit WA-C(pTRANS,pCJYM) inkubierten Thrombozyten. Diese gestörte Adhäsion der Thrombozyten würde nach Croce et al. am ehesten auf eine Hemmung von Calpain hinweisen (Croce et al., 1999). Um einen potentiellen funktionellen Effekt von YopM auf Calpain zu untersuchen, sollte Calpain nach der Inkubation mit WA-C(pTRANS,pCJYM) aktiviert bzw. gehemmt werden. Die Calpainaktivierung könnte durch YopM gehemmt, verstärkt oder nicht beeinträchtigt werden.

Thrombozyten wurden 45min mit dem Stamm WA-C(pTRANS,pCJYM), WA-C(pTRANS,pCJYE138-YO) bzw. WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) in einer MOI von 1:3 inkubiert. Die MOI musste in diesen Versuchen niedriger gewählt werden, um technisch ein günstiges Lösungsverhältnis zwischen Thrombozyten und Yersinien zu erhalten. Nach 45min Inkubation wurden die Thrombozyten 60min entweder aktiviert mit 1mg/ml Fibrinogen, 1mM CaCl_2 , 1µM Ionophor oder gehemmt mit 1mg/ml Fibrinogen, 1mM EGTA, 2mM MgCl_2 und 1µM Ionophor. Nach der Lyse wurden die gesamten Proben auf einem 8%-igen SDS-Gel aufgetrennt und ein Westernblot mit anti-Calpain-Antikörpern durchgeführt.

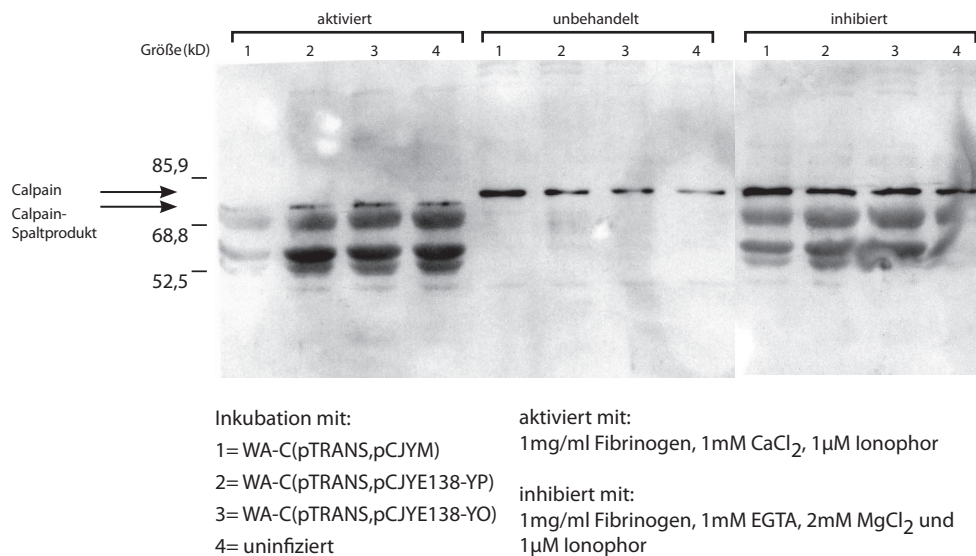


Abbildung 25: YopM kann die Aktivierung bzw. Hemmung von Calpain nicht beeinflussen.

3×10^8 Thrombozyten wurden in einer MOI von 1:3 mit WA-C(pTRANS,pCJYM), WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) bzw. WA-C(pTRANS,pCJYO) für 45min bei 37°C inkubiert. Danach wurden aktivierende bzw. hemmende Zusätze für 60min bei RT zugegeben, lysiert und zentrifugiert (4°C, 20min, 16.000g). Die Überstände wurden auf einem 8%-igen SDS-Gel aufgetrennt, Calpain mit anti-Calpain-Antikörpern (10μg/ml) detektiert.

Die aktivierten Proben zeigen eine Bande bei 76kD, die dem gespaltenen Calpain entspricht. Zwischen den uninizierten und den mit den angegebenen Yersinienstämmen inkubierten Thrombozyten gibt es keinen Unterschied. Auch unter den Yersinienstämmen gibt es keine Unterschiede. So können YopM, YopO und YopP die Autodegradation von Calpain unter diesen Bedingungen nicht hemmen.

Die unbehandelten Proben und die gehemmten Proben zeigen das ungespaltene Calpain bei 80kD, d.h. YopM, YopO und YopP können die Autodegradation von Calpain unter diesen Bedingungen nicht aktivieren.

3.4.2 Dauer der Calpainaktivierung in mit Yop-Monosekretionsmutanten inkubierten Thrombozyten

Da in 3.4.1 kein Einfluss von YopM auf die Aktivierung bzw. Hemmung von Calpain sichtbar wurde, sollte die Zeitdauer der Aktivierung von Calpain variiert werden, um einen zeitabhängigen Einfluss von YopM auf die Calpainspaltung zu untersuchen. YopM könnte die Spaltung von Calpain nicht hemmen sondern verlangsamen bzw. die Spaltung nicht aktivieren sondern beschleunigen.

Thrombozyten wurden in einer MOI von 1:3 mit WA-C(pTRANS,pCJYM) bzw. WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) 45min inkubiert, danach Calpain mit 1mg/ml Fibrinogen, 1μM Ionophor und 1mM CaCl₂ aktiviert. Nach 30sec, 5min, 15min, 30min und 60min wurden die aktivierten Thrombozyten lysiert, auf einem 8%-igen SDS-Gel aufgetrennt und Calpain mit anti-Calpain-Antikörpern detektiert.

Bei Inkubation von Thrombozyten mit WA-C(pTRANS,pCJYM) bzw. WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) und Aktivierung von Calpain ist nach 30sec die 80kD-Bande von Calpain nachweisbar. D.h. Calpain

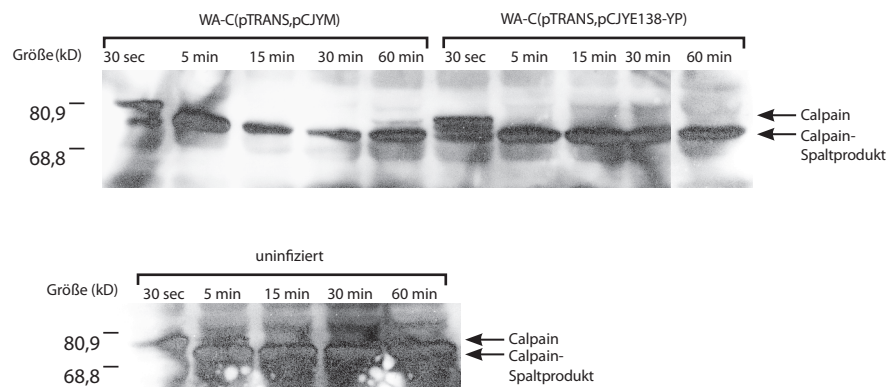


Abbildung 26: YopM und YopP zeigen keinen zeitabhängigen Einfluss auf die Proteolyse von Calpain.

3×10^8 Thrombozyten wurden in einer MOI von 1:3 mit WA-C(pTRANS,pCJYM) bzw. WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) für 45min inkubiert, danach wurde Calpain durch Zugabe von 1mg/ml Fibrinogen, $1 \mu\text{M}$ Ionophor, 1mM CaCl_2 für 30sec bis 60min aktiviert. Nach der Lyse wurden die Proben auf einem 8%-igen SDS-Gel aufgetrennt und Calpain mit anti-Calpain-Antikörpern ($10 \mu\text{g/ml}$) detektiert.

ist nach 30sec noch nicht gespalten. Nach 5min ist die 76kD-Bande sichtbar, d.h. nach 5min ist Calpain gespalten. Bei uninfizierten Thrombozyten und Aktivierung von Calpain ist nach 30sec die 80kD-Bande von Calpain nachweisbar. D.h. Calpain ist nach 30sec, wie die mit Yop-Monosekretionsmutanten inkubierten Thrombozyten, noch nicht gespalten. Nach 5min ist eine breite 76kD-Bande sichtbar und eine schmale Bande bei 80kD. Da in zwei weiteren Versuchen (nicht gezeigt) die schmale 80kD-Bande nach 5min nicht sichtbar ist, sondern Calpain gespalten ist, muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei der 80kD-Bande um ein Artefakt oder eine Messungsungenauigkeit handelt. Das heißt, Calpain ist nach 5min vollständig gespalten.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM) und YopP aus WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) die Spaltung von Calpain nicht beeinträchtigen, so dass es unwahrscheinlich erscheint, dass YopM und Calpain interagieren.

4. Diskussion

4.1 Untersuchung des Einflusses der *Yersinia*-Yop-Effektorproteine auf das Zytoskelett von Thrombozyten

Unter physiologischen Bedingungen zirkulieren diskoidale Thrombozyten mit einer Größe von $0,5\mu\text{m} \times 3,0\mu\text{m}$ (Hartwig et al., 1999) bzw. $2\text{-}4\mu\text{m}$ (Gawaz, 2001) im Blut ohne mit Strukturen der Gefäßwand in Kontakt zu treten. Eine Schädigung des Gefäßendothels und der Kontakt der Thrombozyten mit subendothelialer Matrix triggert eine Vielzahl von Prozessen. Diese führen dazu, dass Thrombozyten ihren Zustand ändern von diskoiden ruhenden zu aktivierten ausgebreiteten Thrombozyten um die Wunde zu bedecken. Während dieser Aktivierung kommt es zur Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien und zu einer Expansion der Gesamtoberfläche (Hartwig et al., 1999; Gawaz, 2001). Da es nach Inkubation von *Yersinien* mit Thrombozyten zur Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten kommt (Simonet et al., 1992), wurden in dieser Arbeit Thrombozyten mit unterschiedlichen *Yersinia*-Yop-Monodeletions- bzw. Monosekretionsmutanten inkubiert und der Effekt auf das Zytoskelett untersucht. Simonet et al. haben elektronenmikroskopisch nachweisen können, dass *Yersinien* von Thrombozyten internalisiert werden (Simonet et al., 1992).

Zunächst wurde die Morphologie der mit Monosekretionsmutanten und Monodeletionsmutanten inkubierten Thrombozyten fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die beobachteten morphologischen Veränderungen der mit Monosekretionsmutanten inkubierten Thrombozyten wurden differenziert und quantifiziert. Als Morphologieparameter dienten Abrundung, Filopodien- und Lamellipodienbildung, da diese bei der Ausbreitung von Thrombozyten von Croce et al. (Croce et al., 1999) beschrieben werden. Filopodien sind in dieser Auswertung analog zu Potter et al. (Potter et al., 1998) definiert als periphere Aktinmikroausläufer. Lamellipodien sind analog zu Potter et al. definiert als konvexe aktinhaltige Strukturen an der Zellgrenze, die auf eine Ausbreitung der Zelle hinweisen. Der Begriff Abrundung steht, angelehnt an Croce et al. (Croce et al., 1999), für unausgebreitete Thrombozyten, die weder Filopodien noch Lamellipoden vorweisen. Neben der morphologischen Differenzierung wurden die Flächengrößen der Thrombozyten ausgemessen und vergleichend dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass uninfizierte Thrombozyten sich im Zeitverlauf von 5min bis 45min flächig ausbreiten unter Zunahme von Filopodien und Lamellipodien und Abnahme von Abrundungen. Die zunehmende Ausbreitung und Ausbildung von Lamellipodien ist vereinbar mit einer zunehmenden Adhärenz der Thrombozyten auf den Glasplättchen. Zum Zeitpunkt 5min sind die Thrombozyten wenig adhären, zum Zeitpunkt 45min fast vollständig, deswegen wurde die morphologische Differenzierung und die Flächenmessung der Thrombozyten zu den Zeitpunkten 5min, 15min und 45min durchgeführt. So konnte der zeitliche Verlauf der Zellflächenänderung bzw. Morphologieänderung untersucht werden. In den durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass mit der YopP-Monosekretionsmutante inkubierte Thrombozyten ein ähnliches Zytoskelett wie uninfizierte Thrombozyten besitzen. Die Ergebnisse zur morphologischen Differenzierung sind mit denen der Flächenmessung vereinbar: Die im zeitlichen Verlauf vorhandene Zunahme der Fläche der uninfizierten bzw. mit der YopP-Monosekretionsmutante inkubierten Thrombozyten geht mit einer Abnahme der Abrundungen einher.

Wegen der Ähnlichkeit von uninfizierten zu mit der YopP-Monosekretionsmutante inkubierten Thrombozyten konnte die YopP-Monosekretionsmutante als Negativkontrolle eingesetzt werden. Zwischen mit der YopP-Monosekretionsmutante inkubierten bzw. uninfizierten Thrombozyten und mit der YopH, YopM, YopE bzw. YopO-Monosekretionsmutante inkubierten Thrombozyten ist sowohl in der Flächenmessung als auch in der morphologischen Differenzierung ein deutlicher Unterschied zu sehen. Die mit der YopH, YopM, YopE bzw. YopO-Monosekretionsmutante inkubierten Thrombozyten zeigen zu allen Zeitpunkten sehr viel mehr Abrundungen, sie bilden nur wenige Filopodien bzw. Lamellipodien aus. Die vielen Abrundungen deuten auf eine schlechtere Adhäsion hin. Diese spiegelt sich auch in der Flächenmessung wider: Mit der YopH, YopM, YopE bzw. YopO-Monosekretionsmutante inkubierte Thrombozyten besitzen eine deutlich kleinere Zellfläche als mit der YopP-Monosekretionsmutante inkubierte bzw. uninfizierte Thrombozyten. In der Literatur werden durch YopE hervorgerufene Zytoskelettveränderungen bei anderen Zelltypen beschrieben (Rosqvist et al, 1991; Rosqvist et al., 1988). Durch Depolymerisierung von Mikrofilamenten wirkt YopE antiphagozytisch und schützt Yersinien vor Immunzellen des Wirtes (Ruckdeschel et al., 1996; Faellmann et al., 1995; Rosqvist et al., 1988). YopH dephosphoryliert intrazelluläre Bestandteile des fokalen Adhäsionskomplexes, der die Aufgabe hat, Zellen an der extrazellulären Matrix zu befestigen (Hamid et al., 1999). Dies könnte der Grund sein, warum mit WA-C(pTRANS,pCJYH) inkubierte Thrombozyten schlecht adhärieren können. Hakansson et al. beschreiben den Effekt von YopO auf HeLa-Zellen und Makrophagen: Es zeigen sich abgerundete Zellen, die verzweigte Retraktionsfasern ausbilden, sich aber nicht von der extrazellulären Matrix ablösen (Hakansson et al., 1996). Die Dominanz der Abrundungen und die kleinen Flächengrößen von mit WA-C(pTRANS, pCJYE138-YO) inkubierten Thrombozyten sind in dieser Arbeit gut sichtbar. In der Literatur sind bisher keine Zytoskelettveränderungen von Thrombozyten durch YopM beschrieben worden. In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass mit WA-C(pTRANS,pCJYM) inkubierte Thrombozyten viele Abrundungen und kleine Flächengrößen aufweisen, die auf eine schlechte Adhäsion der Thrombozyten an der extrazellulären Matrix hinweisen.

Der beschriebene Unterschied der Morphologie und der Flächengrößen zwischen mit der YopP-Monosekretionsmutante inkubierten und mit der YopH, YopM, YopE bzw. YopO-Monosekretionsmutante inkubierten Thrombozyten könnte darauf hin deuten, dass es sich um einen Yop-spezifischen Effekt auf das Zytoskelett von Thrombozyten handeln könnte. Für die statistische Auswertung fungierten die YopP-Monosekretionsmutante und Versuch 1 als Referenz, das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha=0,05$ festgelegt. Die multivariaten Verfahren ergaben zu allen Zeitpunkten einen signifikanten Einfluss der Monosekretionsmutanten auf die Größe der Zellfläche und die Morphologie der Thrombozyten.

Beim Vergleich der drei zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführten Versuche fiel auf, dass die Thrombozyten in Versuch 2 durchgängig eine grössere Fläche besitzen als in Versuch 1 und 3. Die Flächengröße verhält sich entsprechend der Morphologieänderung: Die größeren Thrombozytenflächen in Versuch 2 könnten durch die kleinere Anzahl der abgerundeten Thrombozyten in Versuch 2 erklärt werden. Obwohl ein Unterschied zwischen den drei Versuchen besteht, kann der oben beschriebene Effekt der Monosekretionsmutanten auf die Flächengröße und die

Morphologieverteilung bei allen Versuchen beobachtet werden: Der Unterschied von mit der YopP-Monosekretionsmutante inkubierten bzw. uninfizierten Thrombozyten zu mit der YopH, YopM, YopE bzw. YopO-Monosekretionsmutante inkubierten Thrombozyten bleibt zu allen Zeitpunkten in allen Versuchen sichtbar. Die Reproduzierbarkeit der Versuche lässt sich statistisch nur zum Zeitpunkt 45min für die morphologische Differenzierung der Thrombozyten belegen. Deswegen könnte es sein, dass nach 45min der beste Zeitpunkt ist, um Morphologieveränderungen reproduzierbar zu differenzieren. Für jeden durchgeführten Versuch wurden frische Thrombozyten von jeweils individuellen Spendern eingesetzt. Thrombozyten sind primäre Zellen, die einer biologischen Variabilität unterliegen.

Dies könnte zumindestens einen Teil der beobachteten Unterschiede in der Flächengröße und der Morphologieverteilung zwischen den an drei unterschiedlichen Tagen durchgeführten Versuchen erklären. Ausserdem wurden insgesamt 1800 Zellen pro Zeitpunkt ausgemessen, verglichen und statistisch ausgewertet. Aufgrund der grossen Fallzahlen können auch kleine Unterschiede zu signifikanten Ergebnissen führen. Beim Vergleich von z.B. uninfizierten Thrombozyten nach 45min in Versuch 1 (Flächengröße $22,5 \mu\text{m}$) zu mit der YopP-Monosekretionsmutante inkubierten Thrombozyten nach 45min in Versuch 1 (Flächengröße $20,54 \mu\text{m}$) kommt es zu einem signifikanten Unterschied, obwohl die Differenz der Flächengröße nur $1,96 \mu\text{m}$ ist. Dieser Unterschied dürfte als nicht relevant angesehen werden. Im Unterschied dazu zeigen z.B. mit der YopM-Monosekretionsmutante inkubierte Thrombozyten (Versuch 1, 45min) eine Flächengröße von $11,65 \mu\text{m}$, d.h. sie haben nur 56% der Flächengröße von mit der YopP-Monosekretionsmutante inkubierten Thrombozyten. Dieser deutliche Effekt dürfte als relevant angesehen werden.

Der Unterschied der Flächengrößen zwischen mit der YopP-Monosekretionsmutante inkubierten Thrombozyten zu mit der YopH, YopM, YopE bzw. YopO-Monosekretionsmutante inkubierten Thrombozyten ist deutlich grösser als der Unterschied der Flächengrößen zwischen den drei Versuchen. Der Mittelwert von Versuch 1-3 von mit der YopP-Monosekretionsmutanten inkubierten Thrombozyten zum Zeitpunkt 45min beträgt $22,49 \mu\text{m}$, der Mittelwert der mit der YopH, YopM, YopE bzw. YopO-Monosekretionsmutante inkubierten Thrombozyten beträgt $11,4 \mu\text{m}$ (YopH), $13,45 \mu\text{m}$ (YopM), $10,09 \mu\text{m}$ (YopE), $10,64 \mu\text{m}$ (YopO), d.h. der Unterschied beträgt 49% (YopH), 40% (YopM), 55% (YopE), 53% (YopO). Der Mittelwert der Abweichungen von Versuch 1-3 für die untersuchten Monosekretionsmutanten zum Zeitpunkt 45min beträgt 28% ($6,25 \mu\text{m}$) bei der YopP-Monosekretionsmutante, 10% ($2,3 \mu\text{m}$) bei der YopH-Monosekretionsmutante, 16% ($3,62 \mu\text{m}$) bei der YopM-Monosekretionsmutante, 8% ($1,84 \mu\text{m}$) bei der YopE-Monosekretionsmutante und 18% ($4,13 \mu\text{m}$) bei der YopO-Monosekretionsmutante. Das deutet darauf hin, dass der oben beschriebene Effekt der YopH, YopM, YopE bzw. YopO-Monosekretionsmutante auf die Flächengröße trotz individueller Schwankungen der Thrombozyten besteht. Da alle Thrombozyten eines Versuches gleich behandelt wurden, würden gegebenenfalls vorhandene Faktoren, die zu einer Voraktivierung der Thrombozyten führen könnten, alle Zellen eines Versuches betreffen. Die Monosekretionsmutanten könnten die Thrombozyten durch Voraktivierung desensibilisieren oder die Sekretion von Adhäsionsmediatoren während der Zentrifugation hemmen. Dadurch könnten die Thrombozyten schlechter adhären. Bei einer möglichen unspezifischen extrazellulären Beeinflussung von Thrombozyten durch Yop-Monosekretionsmutanten sollte es bei allen Zellen, die mit Monosekretionsmutanten inkubiert

wurden, zu einem ähnlichen Effekt kommen. In den Versuchen ist jedoch auffällig, dass mit YopP aus WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) inkubierte Thrombozyten gut adhären können wie uninfierte Thrombozyten und ein Unterschied zu den anderen untersuchten Monosekretionsmutanten sichtbar ist. Da ein intrathrombozytärer fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von YopM nicht gelang, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die beobachteten Zytoskelettveränderungen von Thrombozyten nach Inkubation mit der YopM-Monosekretionsmutante durch einen intrazellulären oder extrazellulären Effekt hervorgerufen werden.

In HeLa-Zellen konnte YopM intrazellulär und intranukleär nachgewiesen werden. Die mit YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierten HeLa-Zellen zeigen Zytoskelettveränderungen, die vereinbar sind mit einer Ablösung der Zelle von der Matrix. Mit YopP aus WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) infizierte HeLa-Zellen zeigten diese nicht. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Zytoskelettveränderungen von mit WA-C(pTRANS,pCJYM) inkubierten Thrombozyten durch YopM-spezifische Wechselwirkungen zustande kommen könnten. Diese Hypothese bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen.

4.2 Einfluss von YopM auf das Zytoskelett und Lokalisation von YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) in HeLa-Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass mit der YopM-Monosekretionsmutante inkubierte Thrombozyten eine verkleinerte Zellfläche und mehr abgerundete Zellen besitzen. Es sollte untersucht werden, ob mit YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierte HeLa-Zellen auch Zytoskelettveränderungen zeigen. Für diese Versuche wurde die HeLa-Zelllinie gewählt, da sie zur Lokalisation von YopM in der Zelle eine geeignete Grösse und einen Zellkern besitzt. Die Translokation von YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) in HeLa-Zellen konnte über Detektion des HA-Tags an YopM nachgewiesen werden. Nach 1-2h Infektionszeit wurde YopM in der infizierten HeLa-Zelle diffus im gesamten Zytosol nachgewiesen. Nach weiterer Inkubationsdauer konnte YopM nach 4h zusätzlich zur Lokalisation im Zytosol im Zellkern nachgewiesen werden. Eine ähnliche Beobachtung machten auch Skrzypek et al., die mit YopM aus *Y. pestis* infizierte HeLa-Zellen untersuchten. Nach 2,5h Infektion konnte YopM fleckweise akkumuliert im Zytosol gefunden werden. Nach 4h konnte YopM im Zytosol und im Zellkern nachgewiesen werden (Skrzypek et al., 1998). Daraus folgt, dass YopM aus beiden *Yersinia*-Spezies *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pestis* nach 4h Infektionszeit in HeLa-Zellen im Zellkern nachgewiesen werden kann. Mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierte HeLa-Zellen zeigen ein ungeordnetes Zytoskelett mit Vakuolen statt des geordneten linearen Verlaufes der Aktinfasern in uninfierten, oder mit dem Kontrollstamm WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) infizierten, HeLa-Zellen. Die mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierten HeLa-Zellen scheinen sich nach 4h Infektion von der Matrix der Deckgläschen zu lösen.

Während Thrombozyten in Suspension mit der YopM-Monosekretionsmutante inkubiert wurden, um dann auf Deckgläschen zu adhären, wurden schon adhärente HeLa-Zellen infiziert. Sowohl mit WA-C(pTRANS,pCJYM) inkubierte Thrombozyten als auch mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierte HeLa-Zellen zeigen beide Störungen des Zytoskeletts. Während bei Thrombozyten eine verspätete Filopodien- und Lamellipodienausbildung und eine verschlechterte Adhärenz mit kleinerer

Zellfächengröße im Vordergrund steht, zeigen die infizierten HeLa-Zellen einen Aktin-Zytoskelett-Umbauprozess, der zu Vakuolen, einem ungeordneten Zytoskelett und zu einer Ablösung der Zelle von den Deckgläschen führt. Da YopM intrazellulär und intranukleär von HeLa-Zellen nachgewiesen werden konnte und die infizierten HeLa-Zellen Zytoskelettveränderungen zeigen, könnte es sein, dass die Zytoskelettveränderungen von mit der YopM-Monosekretionsmutante inkubierten Thrombozyten durch einen intrazellulären Effekt von YopM hervorgerufen werden.

4.3 Einfluss des C-Terminus von YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) auf das Zytoskelett von HeLa-Zellen

Nach 1-2h Infektionszeit wurde YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) in der infizierten HeLa-Zelle diffus im Zytosol nachgewiesen, nach 4h konnte YopM zusätzlich im Zellkern nachgewiesen werden. Mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierte HeLa-Zellen zeigen mit der Infektionsdauer zunehmende Zytoskelettveränderungen. Diese Beobachtungen könnten darauf hin deuten, dass die Translokation von YopM in den Zellkern wichtig ist für die Zytoskelettveränderungen.

Benabdillah et al. konnten für den YopM-Kerntransport wichtige Abschnitte in der Gensequenz von YopM identifizieren. Das wichtigste Signal trägt der C-Terminus von YopM, doch auch die N-terminalen LRR 1-3 scheinen eine Rolle für die Kerngängigkeit zu spielen (Benabdillah et al., 2004). Der in dieser Arbeit klonierten Mutante WA-C(pTRANS,pCJYM Δ 1506-1578-HA) fehlen 24 C-terminale AS, d.h. der C-Terminus ist deletiert. In mit WA-C(pTRANS,pCJYM Δ 1506-1578-HA) infizierten HeLa-Zellen kann das deletierte YopM durch die Schwäche der Färbung nicht genau in der Zelle lokalisiert werden. Das deletierte YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM Δ 1506-1578-HA) leuchtet intrazellulär zu allen Zeitpunkten schwächer als YopM in mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierten HeLa-Zellen. Dafür sind viele induzierte Yersinien des Stammes WA-C(pTRANS,pCJYM Δ 1506-1578-HA) extrazellulär sichtbar, was zu der Vermutung führt, dass der Stamm wesentlich weniger Protein in die Zelle transloziert. Das wenige Protein in der Zelle könnte dazu führen, dass auch nach 6h Infektionszeit mit WA-C(pTRANS,pCJYM Δ 1506-1578-HA) keine wesentlichen Zytoskelettveränderungen der infizierten HeLa-Zellen vorhanden sind.

Es könnte aber auch sein, dass sich durch die Deletion des C-Terminus Yop M und der HA-Tag anders falten, so dass die anti-HA-Antikörper in der eukaryoten Zelle nicht mehr gut an die zu detektierenden Basen binden können. Zum anderen könnte es sein, dass durch die Deletion die YopM-Dimer- bzw. Tetramerbildung nicht mehr möglich ist. Zur Dimerbildung kommt es durch Interaktion der C-Termini und der C-terminalen LRRs von zwei YopM-Monomeren. Zur symmetrischen Tetramerbildung wickeln sich zwei Dimere umeinander (Evdokimov et al., 2001). Evdokimov vermutet, dass die Tetramer-Bildung erst durch Bindung von YopM an das Zielprotein in der eukaryoten Zelle geschieht. Wenn eine Tetramerbildung nicht mehr möglich ist, könnte es sein, dass auch eine Bindung von Zielproteinen nicht mehr möglich wäre und dadurch die Virulenz von YopM nicht mehr vorhanden wäre (Evdokimov et al., 2001). Diese Aussage kann gut auf die Beobachtungen dieser Arbeit angewandt werden: Durch die Deletion des C-Terminus könnte eine Dimer- und Tetramerbildung erschwert bzw. unmöglich werden. Dadurch könnten Zielproteine nicht mehr gebunden werden und es würden sich keine Zytoskelettveränderungen zeigen. Oder aber YopM könnte durch die fehlende Dimer- bzw.

Tetramerbildung als Monomer in der Zelle instabil vorliegen und dadurch angreifbarer für Proteasen sein, die YopM intrazellulär zerstören. Dadurch käme es nur zu einer schwachen bzw. keiner Interaktion mit Zielproteinen und somit zu fehlenden Zytoskelettveränderungen.

Es könnte auch sein, dass der C-Terminus wichtig ist für eine Interaktion von YopM mit Zielproteinen. Da dieser nicht mehr vorhanden ist käme es zu keiner Interaktion und somit zu keinen Zytoskelettveränderungen.

In zukünftigen Forschungen könnten weitere Deletionsmutanten erstellt und deren Einfluss auf das Zytoskelett untersucht werden. Außerdem wäre es interessant zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen einer YopM-Dimer- bzw. Tetramerbildung, Virulenz und Zytoskelettveränderungen besteht.

4.4 Untersuchung der Interaktion zwischen Calpain und YopM *in vivo*

Bei der Zytoskelettausbildung, Zellaggregation und -adhärenz haben Calpain und seine Substrate wichtige regulierende Aufgaben. Calpain reguliert Aktin-Zytoskelett-Umbauprozesse bei endothelialen Wundheilungen und führt zur Ausbreitung von Fibroblasten durch Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien (Croce et al., 1999).

Mit WA-C(pTRANS,pCJYM) inkubierte Thrombozyten zeigen morphologische Ähnlichkeiten zu Thrombozyten, in denen Calpain durch Calpeptin gehemmt wurde. Während mit WA-C(pTRANS,pCJYM) inkubierte Thrombozyten eine schlechte Adhäsion mit kleinerer Zellfläche und eine verspätete Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien aufweisen, zeigen mit Calpeptin vorinkubierte Thrombozyten eine fehlende Ausbreitung des Zytoskeletts und fehlende Filopodienbildung. Dieses Ergebnis ist konsistent zu bereits in der Literatur beschriebenen Beobachtungen von Thrombozyten, die 10min mit Calpeptin vorinkubiert, dann auf Deckgläsern gegeben und nach 20min fixiert wurden. Die Thrombozyten können schlecht adhären, die Zellen sind rund, unausgebreitet und besitzen keine Filopodien bzw. Lamellipodien (Croce et al., 1999). Das heißt, dass durch Hemmung von Calpain mit Calpeptin eine Hemmung des Aktin-Zytoskelett-Umbauprozesses möglich ist (Croce et al., 1999).

Für YopM waren lange keine intrazellulären Interaktionspartner bekannt. Kaya et al. konnten im Affinitätsblot *in vitro* eine Interaktion von YopM mit der intrazellulären Cystein-Protease Calpain zeigen (Kaya et al., Kongressbeitrag 2001). Wegen der morphologischen Ähnlichkeit zwischen mit WA-C(pTRANS,pCJYM) inkubierten bzw. mit Calpeptin inkubierten Thrombozyten sollte die von Kaya et al. dargestellte Interaktion zwischen YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM) und Calpain *in vivo* in dieser Arbeit überprüft werden. Präzipitationsversuche aus infizierten HeLa-Zellen über Calpain sowie über YopM ergaben keinen Hinweis auf eine Interaktion von YopM und Calpain. YopM zeigte eine unspezifische Bindung an Protein A Agarose-beads. Ein Grund für die unspezifische Bindung von YopM an die Beads könnten die zwischen dem N-Terminus und dem C-Terminus kodierten zahlreichen Leuzin-reichen Wiederholungssequenzen (LRR) sein, die unter Proteinen weit verbreitet sind (Kobe et al., 1994). Durch die LRRs weist YopM schwache Homologien zu einer Vielzahl von Proteinen auf (Boland et al., 1998; Kobe et al., 1995), aufgrund derer es unspezifisch an die Agarose-beads binden könnte.

4.5 Untersuchung des funktionellen Einflusses von YopM auf Calpain

Obwohl die Präzipitationsversuche aus infizierten HeLa-Zellen keinen Hinweis auf eine Interaktion von YopM und Calpain ergaben, wurden eventuell bestehende funktionelle Einflüsse von YopM auf Calpain untersucht, weil die Möglichkeit bestand, dass die Bedingungen bei den Präzipitationsversuchen nicht richtig gewählt wurden. Außerdem kann es sein, dass, neben der unspezifischen Bindung von YopM an die Beads, nur kleine Mengen von YopM an Calpain binden, die durch den Antikörper nicht detektiert werden können.

Mit Thrombozyten als Zielzelle konnte ein biochemisches System etabliert werden, in dem Calpain reproduzierbar aktiviert bzw. gehemmt werden konnte. Wie schon in der Literatur beschrieben (Ariyoshi et al., 1995), konnte die Beobachtung gemacht werden, dass es bereits innerhalb der ersten Minuten nach Aktivierung zur Autodegradation von Calpain kommt. Zusätzlich zur Aktivierung bzw. Hemmung der Autodegradation von Calpain wurden Thrombozyten mit den Monosekretionsstämmen WA-C(pTRANS,pCJYM) bzw. WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) inkubiert. Die Inkubation mit WA-C(pTRANS,pCJYM) bzw. WA-C(pTRANS,pCJYE138-YP) konnte die Autodegradation von Calpain unter diesen Umständen weder aktivieren bzw. beschleunigen noch hemmen bzw. verlangsamen. Aufgrund der technischen Möglichkeiten musste die MOI in den Versuchen der Kapitel 3.4.1 und 3.4.2 mit 1:3 gewählt werden. So kann diskutiert werden, ob die Inkubation mit YopM aus WA-C(pTRANS,pCJYM) bei einer MOI von 1:3 überhaupt einen Einfluss auf die Degradation von Calpain haben könnte. Skrzypek et al. konnten mit einer MOI von 1:20 YopM eindeutig im Zellkern von HeLa-Zellen nachweisen (Skrzypek et al., 1998). Das impliziert, dass YopM bei einer MOI von 1:20 auch sein intrazelluläres Zielprotein binden können muss. In den Versuchen im Kapitel 3.3.6 gab es in HeLa-Zellen bei einer MOI von 1:30 keinen Hinweis auf eine Interaktion von YopM mit Calpain. Das legt den Verdacht nahe, dass keine Interaktion besteht und dass YopM auch bei einer höheren MOI keinen Einfluss auf die Autodegradation von Calpain gehabt hätte.

Aufgrund der biochemischen Versuche, in denen weder Hinweise für eine Interaktion zwischen YopM und Calpain, noch Hinweise für eine funktionelle Beeinflussung von Calpain durch YopM gefunden werden konnten, erscheint es unwahrscheinlich, dass YopM und Calpain miteinander interagieren. Auch von Kaya et al. wurden keine neuen Ergebnisse publiziert zur Interaktion zwischen YopM und Calpain. McDonald et al. konnten im Jahr 2003 eine intrazelluläre Interaktion von YopM mit PRK 2 (protein kinase C-like 2) und RSK 1 (p90 ribosomal protein S6 kinase 1) nachweisen, die beide durch Interaktion mit YopM aktiviert werden (McDonald et al., 2003). Funktionelle Studien über das zytoplasmatische Protein PRK 2 lassen darauf schließen, dass PRK 2 eine Komponente in Signalwegen ist, die Einflüsse auf Zytoskelett, Translation und Zellüberleben haben (McDonald et al., 2003). Die Aktivität von PRK 2 wird u.a. stimuliert durch die Bindung an Rho A und führt zum Umbau des Aktin-Zytoskeletts (Zong et al., 1999; Vincent et al., 1997). RSK 1, der zweite von McDonald et al. nachgewiesene Interaktionspartner von YopM, hat regulierende Einflüsse auf Zellproliferation, Translation und Zellüberleben. Es konnte gezeigt werden, dass RSK 1 wie YopM sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorhanden ist (McDonald et al., 2003). Der Nachweis von PRK 2 und RSK 1 als Interaktionspartner von YopM (McDonald et al., 2003) und die Funktionen von PRK 2 und RSK 1 könnten ein Hinweis dafür sein, dass die in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen des

Zytoskeletts durch Interaktion von YopM mit RSK 1 bzw. PRK 2 entstehen könnten. In zukünftigen Forschungen sollte identifiziert werden, ob die Interaktion von YopM mit RSK 1 und PRK 2 für die Zytoskelettveränderungen verantwortlich ist.

4.6 Biologische Relevanz der Ergebnisse

YopM ist entscheidend für die volle Virulenz von Yersinien im Mausinfektionsmodell. Mulder et al. klonierten eine YopM-Monodeletionsmutante (Stamm YopM- *Y. pestis* KIM8-3233 (pPCP1-pCD1[yopM::lacZYA]) und konnten nachweisen, dass Mäuse, die mit dieser Mutante infiziert wurden, 1-4 Tage länger überlebten als Vergleichstiere, die mit Wildtyp-Keimen infiziert worden waren (Mulder et al., 1989). Es konnte gezeigt werden, dass YopM essentiell ist für eine systemische Yersinien-Infektion. Oral zugeführte YopM-Monodeletionsmutanten konnten nur lokal in den Peyer-Plaques nachgewiesen werden, jedoch nicht in Milz und Leber (Trülsch et al., 2004). Ausserdem konnte *in vivo* eine signifikante Verminderung von NK-Zellen durch die Anwesenheit von YopM nachgewiesen werden (Kerschen et al., 2004).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit der Monosekretionsmutante WA-C(pTRANS,pCJYM) inkubierte Thrombozyten eine gestörte Adhäsion bzw. mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierte HeLa-Zellen eine Störung des Zytoskeletts aufweisen. Mit der Monodeletionsmutante WA-P(Δ YM) infizierte Thrombozyten können auf Deckgläschen adhärieren und zeigen eine gut ausgebildete Zytoskelettstruktur.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass YopM Veränderungen am Zytoskelett von Zellen bewirken kann. Sollte bei einer Infektion mit *Yersinia spp.* YopM dazu beitragen, dass die Adhäsion der Zelle und die Ausbildung von Zellausläufern gestört werden, könnte dies zur Blockierung bzw. Schwächung der Migrationsfähigkeit von Abwehrzellen des Wirtes führen und somit zu einer verschlechterten bzw. verzögerten Elimination des Erregers durch das Immunsystem. Dadurch würde YopM entscheidend zur Pathogenität von Yersinien beitragen.

5. Zusammenfassung

Die Pathogenität von enteropathogenen *Yersinien*-Spezies wird von einem Virulenzplasmid pYV kodiert. Das pYV kodiert für den Typ-III-Sekretions-/ Translokationsapparat und die Yops. Sechs Yop-Effektorproteine sind bekannt, die in die eukaryote Zelle transloziert werden: YopE, YopH, YopM, YopO/ YpkA, YopP/ YopJ und YopT (Bolin et al., 1985). Die intrazellulären Angriffspunkte und Wirkungen der einzelnen Yops auf die Zielzelle sind Gegenstand aktueller Forschung.

In dieser Arbeit wurden erstmals systematisch potentielle Zytoskelettveränderungen von Thrombozyten durch Inkubation mit *Yersinia*-Monosekretionsmutanten YopH, YopE, YopO, YopP, YopM und den *Yersinia*-Monodeletionsmutanten Δ YopH, Δ YopE, Δ YopT, Δ YopO und Δ YopM untersucht.

Im zeitlichen Verlauf adhären uninfizierte Thrombozyten durch eine Zunahme der Fläche durch Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien. In den durchgeführten Experimenten ähneln die mit der YopP-Monosekretionsmutante inkubierten Thrombozyten uninfizierten Thrombozyten, d.h. YopP zeigt als Einziges der untersuchten Yops keinen Einfluss auf das Zytoskelett. Mit der YopH, YopM, YopE bzw. YopO-Monosekretionsmutante inkubierte Thrombozyten zeigen kleinere Zellflächen und eine Dominanz von abgerundeten Zellen. Dies deutet auf eine schlechtere Adhäsion der Zellen an der extrazellulären Matrix hin.

In mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierten HeLa-Zellen konnte YopM zunächst im Zytosol, nach 2-4h Infektion zusätzlich im Zellkern lokalisiert werden. Ausserdem zeigten mit WA-C(pTRANS,pCJYM-HA) infizierte HeLa-Zellen Zytoskelettveränderungen: ein ungeordnetes Zytoskelett mit Vakuolen, vereinbar mit einer Ablösung der Zelle von der Matrix.

Kaya et al. konnten im Affinitätsblot *in vitro* eine Interaktion von YopM mit der intrazellulären Cystein-Protease Calpain zeigen (Kaya et al., Kongressbeitrag 2001). Wegen der morphologischen Ähnlichkeit zwischen mit WA-C(pTRANS,pCJYM) inkubierten bzw. mit Calpeptin, einem Calpain-Inhibitor, inkubierten Thrombozyten wurde die von Kaya et al. dargestellte Interaktion zwischen YopM und Calpain *in vivo* in dieser Arbeit überprüft. Die Präzipitationsversuche aus infizierten HeLa-Zellen über Calpain sowie über YopM ergaben keinen Hinweis auf eine Interaktion von YopM und Calpain.

McDonald et al. publizierten RSK 1 und PRK 2 als intrazelluläre Interaktionspartner von YopM. Funktionelle Studien über die Proteine RSK 1 und PRK 2 lassen darauf schließen, dass sie regulierende Einflüsse auf das Zytoskelett, die Translation und das Zellüberleben haben (McDonald et al., 2003).

Diese Funktionen und die beobachteten Einflüsse von YopM auf das Zytoskelett der Zielzelle sind mit einem Modell vereinbar, in dem YopM die Zytoskelettveränderungen durch Interaktion mit RSK 1 und PRK 2 hervorrufen könnte. Diese Hypothese muss durch zukünftige Forschungen geklärt werden.

6. Abkürzungsverzeichnis

α -	anti (als Präfix vor einem Antikörper) oder alpha
Abb.	Abbildung
Ail	attachment invasion locus
AS	Aminosäure(n)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
β -Parameter	Der Regressionskoeffizient β entspricht der erwarteten Änderung der abhängigen Variable bei Änderung der betreffenden unabhängigen Variable um eine Einheit, adjustiert für alle anderen unabhängigen Variablen.
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
Ca^{2+}	Calcium
CaCl_2	Calciumchlorid
CHO-Zellen	Ovarialzellen von chinesischen Hamstern (chinese hamster ovaries)
CO_2	Kohlendioxyd
COS-Zellen	Affennierenzellen
C-term.	carboxyterminaler Teil eines Proteins
D	Domäne
Da	Dalton
d.h.	das heißt
Δ	delta (außer)
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate
ds	doppelsträngig
ECA	Enterobacteriaceae-common-Antigen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetylen
EGTA	Ethylenglycobis(2-amino-ethylther)-N',N',N',N'-tetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FA	focal adhesion
FAE	follikelassoziertes Epithel
FAK	focal adhesion kinase
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein- Isothiocyanat

g	Erdbeschleunigung (9,81m/s)
GAPs	GTPase activating proteins
ggf.	gegebenenfalls
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptor (G-protein-coupled receptor)
GP-Ib	Glykoprotein Ib
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HCl	Salzsäure
IFT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IL-8	Interleukin-8
IP	Immunpräzipitation
kb	1000 Basenpaare
kD	1000 Dalton
L	Lysat
LB	Luria-broth
LRR	Leuzin-reiche Wiederholungsmotive
MAP-Kinase	Mitogen activated protein kinase
MBS	Myosin-binding subunit
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MLC	Leicht Kette des Myosin
MCP1	makrophagen chemoattractant protein 1
MCS	multiple cloning site
min	Minute
MOI	multiplicity of infection
MTB	Modified Tyrodes Buffer
MyfA/PsaA	mucoide yersinia fibrillae/ pH6-Antigen
M-Zellen	membranöse Epithelzellen
nCL	novel Calpain Large subunit
NLS	Kernlokalisations-Signal (nuclear localization signal)
nm	nano meter
N-term.	aminoterminaler Teil eines Proteins
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
OR	Odds ratio
p.a.	per analysis
PAGE	Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese
PAK	p21-aktivierte Kinase
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBS-T	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
PCR	Polymerasekettenreaktion

Pen/ Strep	Penicillin/ Streptomycin
PEG _{8000/4000}	Polyethylenglycol
PIP ₃	Phospho-Inositol-Trisphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POX	Peroxidase
PP	Peyer Plaques
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pYV-Plasmid	plasmid of <i>Yersinia</i> virulence
R ²	multiplies Bestimmtheitsmaß entspricht dem Erklärungswert des Modells und dient der Beurteilung der Güte der Regression
R/P	Rhodamin/ Phalloidin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Rothwell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
ss	einzelsträngig (single-strand)
Syc	specific Yop chaperone
T	Thymin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamine
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethyl Rhodamin
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
U	Enzymeinheit Unit
ü.N.	über Nacht
V	Volt
v.a.	vor allem
Vol.	Volumen
v/v	Verhältnis Volumen zu Volumen
v/w	Verhältnis Gewicht zu Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation
<i>Y. spp.</i>	<i>Yersinia subspezies</i>
Yop(s)	Yersinia outer protein(s)
WB	Westernblot
Wt	Wildtyp

7. Literaturverzeichnis

- Aepfelbacher, M., Zumbihl, R., Ruckdeschel, K., Jacobi, C., Barz, C. and J. Heesemann. The tranquilizing Injection of Yersinia Proteins: A Pathogen`s Strategy to resist host defenses. Biol. Chem. 1999; 380: 795-802
- Aepfelbacher, M. und J. Hesseemann. Modulation of Rho GTPases and the actin cytoskeleton by *Yersinia* outer proteins (Yops). Int. J. Med. Microbiol. 2001; 291: 269-276
- Aili, M., Telepnev, M., Hallberg, B., Wolf-Watz, H. und R. Rosqvist. In vitro GAP activity towards RhoA, Rac1 and Cdc42 is not a prerequisite for YopE induced HeLa cell cytotoxicity. Microb. Pathog. 2003; 34(6): 297-308
- Allen, R. D., Zacharski, L. R., Widirstky, S. T., Rosenstein, R., Zaitlin, L. M. und D. R. Burgess. Transformation and motility of human platelets. J. Cell. Biol. 1979; 83:126-142.
- Andor, A., Trülzsch, K., Essler, M., Roggenkamp, A., Wiedemann, A., Heesemann, J. und M. Aepfelbacher. YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. Cell. Microbiol. 2001; 3(5): 301-10.
- Ariyoshi, H., Oda, A. und E. W. Salzman. Participation of Calpain in protein-tyrosine phosphorylation and dephosphorylation in human blood platelets. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1995; 15(4): 511-514
- Arthur, J. S. C. and C. Crawford. Investigation of the interaction of M-calpain with phospholipids: Calpain-Phospholipid interactions. Biochem. Biophys. Acta. 1996; 1293: 201-206
- Arthur, J. S., Elce; J. S., Hegadorn, C., Williams, K. and P. A. Greer. Disruption of the murine calpain small subunit gene, Capn4: calpain is essentiell for embryonic development but not for cell growth and division. Mol. Cell. Biol. 2000; 20: 4474-4481
- Autenrieth, I. B. and R. Firsching. Penetration of M cells and destruction of Peyer`s Patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. J. Med. Microbiol. 1996; 44: 285-294
- Baki, A., Tompa, P., Alexa, A., Molnar, O. und P. Friedrich. Autolysis parallels activation of μ -Calpain. Biochem. J. 1996; 318: 897-901
- Banik, N. L. Pathogenesis of myelin breakdown in demyelinating diseases: role of proteolytic enzymes. Crit. Rev. Neurobiol. 1992; 4: 257-271

Barz , C., Abahij, T. N., Trülsch, K. und J. Heesemann. The Yersinia Ser/ Thr protein kinase YpkA/ Yop O directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. FEBS Letters 2000; 482: 139-143

Benabdillah, R., L. J. Mota, S. Lützelshwab, E. Demoinet und G. R. Cornelis. Identification of a nuclear targeting signal in Yop M from *Yersinia spp.* Microb. Path. 2004; 36(5): 247-261

Black, D. S. und J. B. Bliska. Identification of p130Cas as a substrate of Yersinia Yop H, a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. EMBO J. 1997; 16: 2730-2744

Black, D. S. und J. B. Bliska. The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin Yop E is required for antiphagocytic function and virulence. Mol. Microbiol. 2000; 37: 515-527

Bilowska, K., Kulkarni, S., Du, X., Goll, D. E., Saido, T. C. und J. E. B. Fox. Evidence that $\beta 3$ integrin-induced rac activation involves the calpain-dependent formation of integrin clusters that are distinct from the focal complexes and focal adhesions that form as Rac and Rho A become active. J. Cell. Biol. 2000; 151: 685-696

Bohn, E., Muller, S., Lauber, J., Geffers, R., Speer, N., Spieth, C., Krejci, J., Manncke, B., Buer, J., Zell, A. und I. B. Autenrieth. Gene expression patterns of epithelial cells modulated by pathogenicity factors of *Yersinia enterocolitica*. Cell Microbiol. 2004; 6(2): 129-41

Boland, A., Sory, M. P., Iriarte, M., Kerbourn, C., Wattiau, P. and G. R. Cornelius. Status of Yop M and Yop N in the Yersinia Yop virulon: Yop M of *Y. enterocolitica* is internalised inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the Yop B, D, N delivery apparatus. EMBO J. 1996; 15: 5191-5201

Boland, A., Havaux, S. and G. R. Cornelis. Heterogeneity of the *Yersinia* Yop M protein. Microb. Pathog. 1998; 25: 343-348

Boland, A. und G. R. Cornelis. Role of Yop P in suppression of tumor necrosis factor a release by macrophages during *Yersinia* infection. Infect. Immun. 1998a; 66: 1878-1884

Bolin, I., Portnoy, D. A. und H. Wolf-Watz. Expression of the temperatur-inducible outer membrane proteins of *Yersiniae*. Infect. Immun. 1985; 48: 234-240

Bolli, R., Cannon, R. O., Speir, E., Goldstein, R. E. und S. E. Epstein. Role of cellular proteinases in acute myocardial infarction. I. Proteolysis in nonischemic and ischemic rat myocardium and the effects of antipain, leupeptin, pepstatin and chymostatin administered *in vivo*. J. Am. Coll. Cardiol. 1983; 4: 671-680

- Clarac, E. A. and J. S. Brugge. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*. 1995; 268: 233-239
- Cornelis, G. R. and H. Wolf-Watz. The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eucaryotic cell. *Mol. Microbiol.* 1997; 23: 861-867
- Cornelis, G. R., Boland, A., Boyd, A. P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M. P. and I. Stainier. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998; 62: 1315-1352
- Cornelis, G. R. The *Yersinia* Ysc-Yop `Type 3` Weaponry. *Nature* 2002; 3: 742-752
- Croce, K., Flaumenhaft, R., Rivers, M., Furie, B., Furie, B.C., Herman, I.M., Potter, D.A. Inhibition of calpain blocks platelet secretion, aggregation, and spreading. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(51): 36321-36327
- Deshpande, R. V., Goust, J. M., Hogan, E. L. und N. L. Banik. Calpain secreted by activated human lymphoid cells degrades myelin. *J. Neurosci. Res.* 1995; 2: 259-265
- Dourdin, N., Bhatt, A. K., Dutt, P., Greer, P. A., Arthur, J. S., Elce, J. S. und A. Huttenlocher. Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 48382-48388
- Dukuzumuremyi, J.-M., Rosquist, R., Hallberg, B., Akerström, B., Wolf-Watz, H. und K. Schesser. The *Yersinia* protein kinase A is a host factor inducible Rho A/ Rac-binding virulence factor. *J. Biol. Chem.* 2000; 45: 35281-35290
- Evdokimov, A. G., Anderson, D. E., Routzahn, K. M. und D. S. Waugh. Unusual molecular architecture of the *Yersinia pestis* cytotoxin Yop M: a leucin-rich repeat protein with the shortest repeating unit. *J. Mol. Biol.* 2001; 312: 807-821
- Fabio, R., Zanetti, A., Sironi, M., Poletarutti, N., Lanfranccone, L., Dejana, E. und F. Colotta. Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. *J. Cell Biol.* 1994; 127: 537-546
- Fällmann, M., Andersson, K., Hakansson, S., Magnusson, K. E., Stendahl, O. und H. Wolf-Watz. *Yersinia pseudotuberculosis* inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells. *Infect. Immun.* 1995; 63: 3117-3124
- Fällman, M., Persson, C. und H. Wolf-Watz. *Yersinia* proteins that target host cell signaling pathways. *J. Clin. Invest.* 1997; 99: 1153-1157

- Fauci, B., Isselbacher, Wilson, Martin, Kasper, Hauser, Longo, Harrison`s principles of internal medicine. Vol. 14th edition. N. Y., 1998
- Forsberg, A. und H. Wolf-Watz. Genetic analysis of the Yop E region of *Yersinia spp.*: identification of a novel conserved locus, *yerA*, regulating Yop E expression. J. Bacteriol. 1990; 172: 1547-1555
- Fu, J. und J. E. Galan. A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. Nature 1999; 401: 293-297
- Galyov, E. E., Hakansson, S., Forsberg, A. and H. Wolf-Watz. A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. Nature 1993; 361: 730-732
- Gawaz M. Blood platelets - physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles, and therapy for atherothrombotic diseases. New York, Thieme; 2001: 1-56
- Glading, A., Lauffenburger, D. A. und A. Wells. Cutting the chase: calpain proteases in cell motility. Trends Cell. Biol. 2002; 12: 46-54
- Goehring, U. M., Schmidt, G., Pederson, K. J., Aktories, K. und J. T. Barbieri. The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzym S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. J. Biol. Chem. 1999; 274: 36369-36372
- Gralnick, H. R., Williams, S., McKeown, L. P., Hansmann, K., Fenton 2 J. W. and H. Krutzsch. High-affinity a thrombin binding to platelet glycoprotein 1b-a: identification of two binding domains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994; 91: 6334-6338
- Guan, K. L. and J. E. Dixon. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. Science 1990; 249: 553-556
- Guroff, G. A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. J. Biol. Chem. 1964; 239: 149-155
- Hacker, J. und J. Heesemann. Molekulare Infektionsbiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2000
- Haddad, L., Evans, J. C., Gharani, I. N., Robertson, C., Rush, K., Wiltshire, S., Frayling, T. M., Wilkin, T. J., Demaine, A., Millward, A., Hattersley, A. T., Conway, G., Cox, N. J., Bell, G. I., Franks, S. and M. I. McCarthy. Variation within the Type 2 Diabetes Susceptibility Gene Calpain-10 and Polycystic Ovary Syndrome. J. Clin. Endocrin. Met. 2002; 87(6): 2606 –2610

- Hakansson, S., Galyov, E. E., Rosquist, R. and H. Wolf-Watz. The *Yersinia* YpkA Ser/ Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. *Mol. Microbiol.* 1996; 20: 593-603
- Hamid, N., Gustavsson, A., Andersson, K., McGee, K., Persson, C., Rudd, C. E. and M. Fallman. Yop H dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. *Microb. Pathog.* 1999; 27(4): 231-242
- Hanks, S. K. und A. M. Quinn. Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol.* 1991; 200: 38-62
- Hanski, C., Kutschka, U., Schmoranzer, H. P., Naumann, M., Stallmach, A., Hahn, H., Menge, H. und E. O. Riecken. Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* Serotype 08 with intestinal mucosa during experimental enteritis. *Inf. Immun.* 1989;57:673-678
- Hartwig, J. H., Barkalow, K., Azim, A. und J. Italiano. The elegant platelet: Signals controlling actin assembly. *Thromb. Haemost.* 1999; 82(2): 392-298
- Hayashi, M., Suzuki, H., Kawashima, S., Saido, T. C. und M. Inomata. The behavior of calpain-generated N- and C-terminal fragments of Talin in integrin-mediated signaling pathways. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999; 371(2): 133-141
- Heesemann, J., Gross, U., Schmidt, N. und R. Laufs. Immunchemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia sp.* grown in calcium-deficient media. *Infect. Immun.* 1986; 54: 561-567
- Heesemann, J., Eggers, C. und J. Schröder. Serological diagnostics of Yersiniosis by immunoblot technique using virulence-associated antigen of enteropathogenic yersiniae. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 1987; 9: 285-289
- Hines, J., Skrzypek, E., Kajava, A. V. and S. C. Straley. Structure-function analysis of *Yersinia pestis* Yop M's interaction with anti-thrombin to rule on its significance in systemic plaque and to model Yop M's mechanism of binding host proteins. *Microb. Pathog.* 2001; 30(4): 193-209
- Hiroaki, I., Hiroshi, N. und O. Hiroto. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 1990; 96: 23-28
- Huttenlocher, A., Palecek, S., Lu, Q., Zhang, W., Mellgren, R., Lauffenburger, D., Ginsberg, M., Horwitz, A. Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 32719-32722

- Ikura, M. Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *TIBS*. 1996; 21: 14-17
- Iriarte, M., Vanooteghem, J. C., Delor, I., Diaz, R., Knutton, S. und G. R. Cornelius. The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* 1993; 9: 507-520
- Iriarte, M. und G. R. Cornelis. Yop T, a new *Yersinia* effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol. Microbiol.* 1998; 29: 915-929
- Iriarte, M., Sory, M. P., Boland, A., Boyd, A. P., Mills, S. D., Lambermont, I. und G. R. Cornelis. TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of *Yersinia* Yop effectors. *EMBO J.* 1998; 17: 1907-1918
- Johnson, P. Calpains (intracellular calcium-activated cysteine proteinases): structure-activity relationships and involvement in normal and abnormal cellular metabolism. *Int. J. Biochem.* 1990; 22: 811-822
- Juris, S. J., Rudolph, A.E., Huddler, D., Orth, K. and J. E. Dixon. A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: Actin binding, kinase activation and cytoskeleton disruption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97(17): 9431-9436
- Juris, S., Shao, F. und J. E. Dixon. *Yersinia* effectors target mammalian signalling pathways. *Cell. Microbiol.* 2002; 4: 201-211
- Kaya, Y. H., Shearer, A., Skrzypek, E., Whiteheart, W. S., Lollike, K. und S. C. Straley. Identification of a potential molecular target of *Yersinia pestis* Yop M. *ASM 101st general meeting*, 2001, Abstract D-113
- Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J. und R. M. Zinkernagel. *Medizinische Mikrobiologie*. 9. Auflage, Thieme-Verlag, 1998: 274-290
- Kerschen, E. J., D. A. Cohen, A. M. Kaplan und S. C. Straley. The plague virulence protein Yop M targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells. *Infect. Immun.* 2004; 72(8): 4589-4602
- Kinbara, K., Sorimachi, H., Ishiura, S., Suzuki, K.: Skeletal muscle-specific calpain, p94. Structure and physiological function. *Biochem. Pharmacol.* 1998; 56: 415-420
- Kobe, B. und J. Deisenhofer. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem. Sci.* 1994; 19: 415-420

- Kobe, B. und J. Deisenhofer. Proteins with leucine-rich repeats.
Curr. Opin. Struct. Biol. 1995; 5: 409-416
- Kobe, B. und A. V. Kajava. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif.
Curr. Opin. Struct. Biol. 2001; 11:725-732
- Krall, R., Zhang, Y. und J. T. Barbieri. Intracellular membrane localization of pseudomonas ExoS and *Yersinia* YopE in mammalian cells. J. Biol. Chem. 2004; 279(4): 2747-53
- Kulkarni, S., Goll, D. E. und J. E. B. Fox. Calpain cleaves Rho A generating a dominant negative form that inhibits integrin-induced actin filament assembly and cell spreading.
J. Biol. Chem. 2002; 171: 4623-4632
- Kuwaki, T., Satoh, H., Ono, T., Shibayama, F., Yamashita, T. und T. Nishimura. Nilvadipine attenuates ischemic degradation of gerbil brain cytoskeletal proteins. Stroke 1989; 1: 78-83
- Lambert de Rouvroit, C. L., Sluiter, C. und R. R. Cornelius. Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*.
Mol. Microbiol. 1992; 6: 395-409
- Lee, V. T., Anderson, D. M. und O. Schneewind. Targeting of Yersinia Yop proteins into the cytosol of HeLa cells: one step translocation of Yop E across bacterial and eucaryotic membranes is dependent on SycE chaperone. Mol. Microbiol. 1998; 28: 593-601
- Leung, K. Y. und S. C. Straley. The Yop M gene of *Yersinia pestis* encodes a released protein having homology with the human platelet surface protein GP1b-a. J. Bacteriol. 1989; 171: 4523-4632
- Leung, K. Y., Reisner, B. S. und S. C. Straley. Yop M inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. Infect. Immun. 1990; 58: 3262-3271
- Li, S. J. und M. Hochstrasser. A new protease required for cell-cycle progression in yeast.
Nature 1999; 398: 246-251
- Logsdon, L.K. und J. Meccas. Requirement of the *Yersinia pseudotuberculosis* effectors YopH and YopE in colonization and persistence in intestinal and lymph tissues.
Infect. Immun. 2003; 71(8): 4595-607
- Maki, M., Bagci, H., Hamaguchi, K., Ueda, M., Murachi, T. und M. Hatanaka. Inhibition of calpain by a synthetic oligopeptide corresponding to an exon of the human calpastatin gene.
J. Biol. Chem. 1989; 264: 18866-18869

De Marco, L., Mazzucato, M., Masotti, A. and Z. M. Ruggeri. Localisation and characterisation of an alpha thrombin binding site on platelet glycoprotein 1b-a. J. Biol. Chem. 1994; 269: 6478-6484

McDonald, C., Vacratsis, P. O., Bliska, J. B. und J. E. Dixon. The *Yersinia* virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. J. Biol. Chem. 2003; 278(20): 18514-23

Michiels, T., Wattiau, P., Brasseur, R., Ruyschaert, J.-M. und G. Cornelius. Secretion of Yop Proteins by *Yersinia*. Infect. Immun. 1990; 58: 2840-2849

Michiels, T. und G. R. Cornelius. Secretion of hybrid proteins by the *Yersinia* Yop export system. J. Bacteriol. 1991; 173(5): 1677-1685

Monack, D. M., Meccas, J., Bouley, D. und S. Falkow. *Yersinia*-induced apoptosis in vivo aids in the establishment of a systemic infection of mice. J. Exp. Med. 1998; 188: 2127-2137

Mukhopadhyay, S., Ramars, A. S. S., Ochs, H. D. und D. Dash. Bruton's tyrosine kinase is a substrate of calpain in human platelets. FEBS Letters 2001; 505: 37-41

Mulder, B., Michiels, T., Simonet, M., Sory, M. P. and G. R. Cornelius. Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227. Infect. Immun. 1989; 57: 2534-2541

Murakami, T., Hatanaka, M. und T. Murachi: The cytosol of human erythrocytes contains a highly Ca^{2+} -sensitive thiol protease (Calpain I) and its specific inhibitor protein (Calpastatin). J. Biochem. 1981; 90: 1809-1816

Nakagawa, K., Masumoto, H., Sorimachi, H. and K. Suzuki. Dissociation of m-calpain subunits occurs after autolysis of the N-Terminus of the catalytic subunit, and is not required for activation. J. Biochem. 2001; 130(5): 605-611

Oda, A., Druker, B. J., Ariyoshi, H., Smith, M. und E. W. Salzman. pp⁶⁰Src is an endogenous substrate for Calpain in human blood platelets. J. Biol. Chem. 1993; 268(17): 12603-12608

Ohno, S., Emori, Y. und K. Suzuki. Nucleotide sequence of a cDNA coding for the small subunit of human calcium-dependent protease. Nucleic Acids Res. 14, 5559

Orth, K., Xu, Z., Mudgett, M. B., Bao, Z. Q., Palmer, L. E., Bliska, J. B., Mangel, W. F., Staskawicz, B. and J. E. Dixon. Disruption of signaling by *Yersinia* effector Yop J, a ubiquitin-like protease. Science 2000; 290(5496): 1594-1597

- Pap, M. und G. M. Cooper. Role of translation initiation factor 2B in control of cell survival by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 β signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 2002; 22(2): 578-86
- von Pawel-Rammingen, U., Telepnev, M. V., Schmidt, G., Aktories, K., Wolf-Watz, H. und R. Rosqvist. GAP activity of the *Yersinia* Yop E cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol. Microbiol.* 2000; 36: 737-748
- Perrin, B. J. und A. Huttenlocher. Molecules in focus Calpain. *J. Biochem. Cell. Biol.* 2002; 34: 722-725
- Perry, R. D. und J. D. Fetherston. *Yersinia pestis*- Etiologic agent of plague. *Clin. Microb. Rev.* 1997; 10: 35-66
- Persson, C., Carballeira, N., Wolf-Watz, H. and Fallman, M. The PTPase Yop H inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J.* 1997; 16: 2307-2318
- Potter, D. A., Tirnauer, J. S., Janssen, R., Croall, D. E., Hughes, C. N., Fiacco, K. A., Mier, J. W., Maki, M. and I. M. Herman. Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J. Cell. Biol.* 1998; 141: 647-662
- Portnoy, D. A. und R. J. Martinez. Role of a plasmid in the pathogenicity of *Yersinia* species. *Curr. Topics Microbiol. Immun.* 1985; 118: 29-51
- Potter, D. A., Tirnauer, J. S., Janssen, R., Croall, D. E., Hughes, C. N., Fiacco, K. A., Mier, J. W., Maki, M. and I. M. Herman. Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J. Cell. Biol.* 1998; 141: 647-662
- Rehm, H. Der Experimentator: Proteinbiochemie/ Proteomics. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2000
- De Rosbo, N. K. und C.C. Bernard. Multiple sclerosis brain immunoglobulins stimulate myelin basic protein degradation in human myelin: a new cause of demyelination. *J. Neurochem.* 1989; 2: 513-518
- Robert Koch-Institut: Pest.
Online im Internet: URL: <http://www.rki.de/INFEKT/ALARM/ANH2B.PDF> (Stand: 25.01.2005)
- Rosqvist, R., Bölin, I., H. Wolf-Watz. Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop 2b protein. *Infect. Immun.* 1988; 56: 2139-2143

Rosqvist, R., Forsberg, A., Rimpiläinen, M., Bergmann, T. und H. Wolf-Watz. The cytotoxic protein Yop E of *Yersinia* obstructs the primary host defence. *Mol. Microbiol.* 1990; 4: 657-667

Rosqvist, R., Forsberg, A., H. Wolf-Watz. Intracellular targeting of the *Yersinia* Yop E cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect. Immun.* 1991; 59: 4562-4569

Rosqvist, R., Magnusson, K.-E. und H. Wolf-Watz. Target cells contact triggers expression and polarized transfer of Yop E cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J.* 1994; 13: 964-972

Ruckdeschel, K., Roggenkamp, A., Schubert, S., and J. Heesemann. Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect. Immun.* 1996; 64: 724-733

Ruckdeschel, K., Harb, S., Roggenkamp, A., Hornef, M., Zumbühl, R., Köhler, S., Heesemann, J. and B. Rouot. *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF- κ B: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J. Exp. Med.* 1998; 187: 1-11

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und H. A. Ehrlich. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-492

Sakihama, T., Kakidani, H., Tenita, K., Yumoto, N., Kikuchi, T., Sasaki, T., Kannagi, R., Nakanishi, S., Ohmori, M., Takio, K. A putative Ca²⁺-binding protein: structure of the light subunit of porcine calpain elucidated by molecular cloning and protein sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985; 82: 6075-6079

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und T. Maniatis. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y., 2.Auflage 1989

Sann, H. Vergleichende Untersuchungen über die Aktivierung von isoliertem Calpain und einer calcium-abhängigen cytosolischen Protease in Linsenepithelzellen. Promotionsarbeit an der Universität Halle, 2000

Sauvonnet, N., Pradet-Balade, B., Garcia-Sanz, J. A. and G. R. Cornelius. Regulation of mRNA expression in macrophages following *Yersinia enterocolitica* infection: role of different Yop effectors. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 25133-25142

Schesser, K. et al. The Yop J locus is required for *Yersinia*-mediated inhibition of NF- κ B activation and cytokine expression: Yop J contains a eucaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. *Mol. Microbiol.* 1998; 28: 1067-1079

Schoenwaelder, S. M., Yuan, Y., Coory, P., Salem, H. H. und S. P. Jackson. Calpain Cleavage of focal adhesion proteins regulates the cytoskeletal attachment of integrin $\alpha 2\beta 3$ (Platelet glycoprotein 2b/3a) and the cellular retraction of fibrin clots. *J. Biol. Chem.* 1997; 17: 1694-1702

Shao, F., Merritt, P. M., Bao, Z., Innes, R. W. und J. E. Dixon. A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* 2002; 109: 575-588

Shayegani, M., DeForge, I., McGlynn, D. M. und Root. Characteristics of *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from human and environmental sources. *J. Clin. Microbiol.* 1982; 14: 304-312

Shepel, M., Boyd, J., Luider, J. und A. P. Gibb. Interaction of *Yersinia enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* with platelets. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50(12): 1030-8

Simonet, M., Triadou, P., Frehel, C., Morel-Kopp, M. C., Kaplan, C. und P. Berche. Human platelet aggregation by *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by invasin. *Infect. Immun.* 1992; 60(2): 366-73

Simonet, M., S. Richard und P. Berche. Electron microscopic evidence for in vivo extracellular localisation of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid. *Infect. Immun.* 1990; 58:841-845

Skrzypek, E., Myers-Morales, T., Whiteheart, S. W. und S. C. Straley. Application of a *Saccharomyces cerevisiae* model to study requirements for trafficking of *Yersinia pestis* YopM in eucaryotic cells. *Infect. Immun.* 2003; 71(2): 937-47

Skrzypek, E., Cowan, C. und S. C. Straley. Targeting of the *Yersinia pestis* Yop M protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Mol. Microbiol.* 1998; 30(5): 1051-1065

Sory, M. P. und G. R. Cornelius. Translocation of a hybrid Yop E-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa-cells. *Mol. Microbiol.* 1994; 14: 583-594

Sory, M. P., Boland, A., Lambermont, I. und G. R. Cornelius. Identification of the Yop E and Yop H domains required for secretion and internalisation into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 11998-12002

- Suggs, S. V., Hirose, T., Miyake, T., Kawashima, E. H., Johnson, M. J., Itakura, K. und R. B. Wallace. Use of synthetic oligo-desoxyribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences using purified genes. *Developmental Biology* (Herausgeber: Brown, D. D. und C. F. Fox). Academic Press, N. Y., 1981
- Sugita, H., Ishiura, S., Suzuki, K. und K. Imahori. Ca-activated neutral protease and its inhibitors: in vitro effect on intact myofibrils. *Muscle Nerve* 1980; 4: 335-339
- Suzuki, K. und H. Sorimachi: A novel aspect of calpain activation. *FEBS Letters* 1998; 433: 1-4
- Tiovanen, A., Granfors, K., Lahesmaa-Rantala, R., Leino, R., Stahlberg, T. and R. Vuento. Pathogenesis of *Yersinia*-triggered reactive arthritis: immunological, microbiological and clinical aspects. *Immun. Rev.* 1985; 86: 47-70
- Tolnai, S. und I. von Althen. Calcium-dependent proteolysis in the myocardium of rats subjected to stress. *Life Sci.* 1987; 9: 1117-1122
- Tompa, P., Emori, Y., Sorimachi, H., Suzuki, K. and P. Friedrich. Domain 3 of calpain is a Ca^{2+} regulated phospholipid-domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 280: 1333-1339
- Trülsch, K., Roggenkamp, A., Aepfelbacher, M., Wilharm, G., Ruckdeschel, K. und J. Heesemann. Analysis of chaperone-dependent Yop secretion/translocation and effector function using a mini-virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2003; 293(2-3): 167-77
- Trülsch, K., T. Sporleder, E. I. Igwe, H. Rüssmann und J. Heesemann. Contribution of the major secreted Yops of *Yersinia enterocolitica* 0:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect. Immun.* 2004; 72(9): 5227-5234
- Vincent, S. und J. Settleman. The PRK2 kinase is a potential effector target of both Rho and Rac GTPases and regulates actin cytoskeletal organization. *Mol. Cell. Biol.* 1997; 17(4): 2247-56.
- Watson, S. P. und K. S. Authi. Platelets, a practical approach. IRL Press at Oxford University Press, N. Y., 1996
- Woestyn, S., Sory, P. M., Boland, A., Lequenne, O. und G. R. Cornelius. The cytosolic SycE and SycH chaperones of *Yersinia* protect the region of Yop E and Yop H involved in translocation across eukaryotic cell membranes. *Mol. Microbiol.* 1996; 20: 1261-1271
- Yan, B., Calderwood, D. A., Yaspan, B. und M. H. Ginsberg. Calpain cleavage promotes Talin binding to the $\beta 3$ Integrin cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(30): 28164-28170

Yang, Y., Merriam, J. J., Mueller, J. P. und R. R. Isberg. The psa locus is responsible for thermoinducible binding of *Yersinia pseudotuberculosis* to cultured cells. Infect. Immun. 1996; 64: 2483-2489

Yao, T., Meccas, J., Healy, J. I., Falkow, S. and Y. Chien. Supression of T and B activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, Yop H. J. Exp. Med. 1999; 190(9): 1343-1350

Yoshida, K., Inui, M., Harada, K., Saido, T. C., Sorimachi, Y., Ishihara, T., Kawashima, S. und K. Sobue. Reperfusion of rat heart after brief ischemia induces proteolysis of caldesmon (nonerythroid spectrin or fodrin) by calpain. Circul. Res. 1995; 77: 603-610

Zong, H., Raman, N., Mickelson-Young, L. A., Atkinson, S. J. und L. A. Quilliam. Loop 6 of RhoA confers specificity for effector binding, stress fiber formation, and cellular transformation. J. Biol. Chem. 1999; 274(8): 4551-60.

Zumbihl, R., Aepfelbacher, M., Andor, A., Jacobi, C. A., Ruckdeschel, K., Rouot, B. and J. Heesemann. The cytotoxin Yop T of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein Rho A. J. Biol. Chem. 1999; 274: 29289-29293

Die vorliegende Arbeit wurde vom 1. September 2001 bis zum 1. Mai 2006 am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Universität München unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann und Frau Dr. med. C. Barz angefertigt.

Ich möchte mich bei Herr Prof. Dr. Dr. J. Heesemann für die Überlassung des Themas bedanken und für die Unterstützung von Seiten des Graduiertenkollegs.

Mein Dank gilt Frau Dr. med. C. Barz, die mir die angewandten Arbeitstechniken beigebracht hat, die Versuchsplanung unterstützt und mein wissenschaftliches Denken geschärft hat.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Katy Niedung bedanken, die immer mit Rat und Tat zur Seite stand und viel Motivationsarbeit geleistet hat.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Pettenkofer-Institutes bedanken, die mir an scheinbaren Sackgassen mit Problemlösungen zur Seite standen.

Für die Thrombozyten möchte ich mich bei Herr Dr. med. Becker vom amtlichen Blutspendedienst München bedanken, der so nett war, mir immer einen kleinen Beutel zur Seite legen zu lassen.

Bei Frau Dr. Geiger von der Klinischen Chemie der LMU München möchte ich mich für den Anti-Calpain-Antikörper bedanken, der für die Versuche dieser Arbeit unerlässlich war.

Ich möchte mich bei meinen Eltern für ihre Offenheit, meine Ausbildung und die Unterstützung meiner Ideen bedanken.

Meinen Geschwistern möchte ich danken, dass sie immer zwei offene Ohren für mich haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Patrick Seelinger für die unablässige Hilfe in der technischen Verarbeitung der Daten. Das hat mir viele Nerven gerettet und meinen Computer vor vielen Abstürzen bewahrt. Neben der technischen Hilfe bin ich für die philosophischen Frühstücksgespräche mit Patrick Seelinger und Thomas Wernbacher dankbar, die viel zur Motivation beigetragen haben.

Meinen nicht erwähnten Freunden möchte ich für die unterschiedlichsten Hilfestellungen, für Rat und Tat und für die Ablenkung zur rechten Zeit danken.

Danke.

Wiebke Lohmann

Bauerstr. 1
80796 München
Tel: 089 - 288 06 223
wiebkelohmann@gmx.de

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 12.02.1979
Geburtsort: Göttingen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Prof. Dr. emerit. Karl Lohmann (Wirtschaftswissenschaften) und Erika Lohmann, wohnhaft in Freiberg (Sachsen)
Geschwister: Prof. Dr. Gerrit Lohmann (Physik), Dr. Dag Lohmann (Physik), Dipl.-Psych. Frauke Weyrich, Dipl.-Des. Imke Lohmann

Ausbildungsdaten

1985 - 1987	Grundschule Höltytschule Göttingen
1987 - 1988	Rudolf Steiner Schule Kassel
1988 - 1998	Waldorfschule Göttingen
1995	Trimester in Rudolf Steiner School, Gloucester, England
1998	Abitur, Göttingen
1998 - 1999	Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU), Studium: Chemie (Diplom)
1999 - 2005	LMU München, Studium: Humanmedizin
1999 - 2004	Leitung der Arbeitskreise für Homöopathie an der LMU München
1999	Praktikum im Kreiskrankenhaus Freiberg
2000	Praktikum im Krankenhaus Borkum
März 2001	Physikum
2001 - 2003	Stipendiatin des Graduiertenkollegs Infektion und Immunität
2001 - 2004	Doktorarbeit am Max von Pettenkofer-Institut, München, Betreuer: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann, Dr. C. Barz, Thema: Analyse der <i>Yersinia</i> -Interaktion mit Thrombozyten unter besonderer Berücksichtigung des YopM Effektorproteins.
2002	Famulatur im Max von Pettenkofer-Institut München
2002	Freisemester im Rahmen der Doktorarbeit
August 2002	1. Staatsexamen
2002	Famulatur in der Habichtswaldklinik Kassel
2003	Famulatur in der Clinica Santa Croce Orselina, Schweiz

2003	Famulatur im Krankenhaus für Naturheilweisen München
September 2004	2. Staatsexamen
2004 - 2005	Praktisches Jahr: 1. Tertial Innere Medizin: Paracelsus-Spital Richterswil, Schweiz 2. Tertial Chirurgie: K. J. Somaiya Hospital, Bombay, Indien K. E. M. Hospital, Bombay, Indien 3. Tertial Pädiatrie: Klinikum Traunstein
Oktober 2005	3. Staatsexamen (LMU München)
November 2005	Approbation
2005 - 2007	Master-Studiengang für Homöopathie an der Universität Sevilla, Spanien
seit Februar 2006	Praxis-Assistenzärztin in München
April 2006	Referentin des Tropenmedizin-Kurs der Medizinischen Fakultät der FSU Jena unter Leitung von Prof. Dr. W. Pfister, Jena
Juni 2007	Master en homeopatía (Universidad de Sevilla, Spanien)

